



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

ipbln



Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

**Papel de la proteína de unión a RNA ZC3H41
en la regulación de los RNA mensajeros que
codifican proteínas ribosomales en
*Trypanosoma brucei***

Universidad de Granada

Programa de doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

Tesis doctoral

GLORIA CEBALLOS PÉREZ

Granada, 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Gloria Ceballos Pérez
ISBN: 978-84-1195-012-1
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84494>



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

**Papel de la proteína de unión a RNA ZC3H41
en la regulación de los RNA mensajeros que
codifican proteínas ribosomales en
*Trypanosoma brucei***

Memoria presentada por la licenciada

GLORIA CEBALLOS PÉREZ

para optar al título de

Doctora por la Universidad de Granada

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Antonio M. Estévez García

Investigador Científico Titular

del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Granada, 2023

RESUMEN.....	9
ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Tripanosomiasis humana africana.....	15
1.1.1. Etiología y epidemiología.....	15
1.1.2. Fisiopatología y tratamiento.....	16
1.2. Características generales de <i>T. brucei</i>	18
1.2.1. Ciclo de vida.....	18
1.2.2. Estructura celular.....	21
1.2.3. Ciclo celular.....	23
1.2.4. Variación antigénica.....	26
1.3. Organización génica y transcripción en <i>T. brucei</i>	27
1.3.1. Organización génica.....	27
1.3.2. RNA polimerasas.....	28
1.3.3. Transcripción.....	29
1.3.4. Maduración del mRNA.....	31
1.3.5. Transporte de mRNA.....	32
1.4. Regulación de la expresión génica en <i>T. brucei</i>	33
1.4.1. Degradación del mRNA.....	34
1.4.2. Proteínas de unión a RNA.....	35
1.4.2.1. Proteínas con dominios de dedos de zinc tipo CCCH.....	36
1.4.2.2. Teoría de los operones o regulones postranscripcionales.....	38
1.4.2.3. Reclutamiento de mRNA en gránulos citoplasmáticos.....	40
1.5. Biogénesis del ribosoma.....	44
1.5.1. Organización génica y procesamiento de los rRNA 18S, 5.8S y 28S.....	45
1.5.2. El RNA ribosómico 5S.....	47

ÍNDICE

1.5.3. Exportación de subunidades y ensamblaje del ribosoma	51
1.6. Traducción.....	53
1.7. La proteína de unión a RNA ZC3H41	55
2. OBJETIVOS.....	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1. Materiales	63
3.1.1. Líneas celulares de <i>Trypanosoma brucei</i>	63
3.1.2. Oligonucleótidos	63
3.1.3. Plásmidos	66
3.1.4. Antibióticos	67
3.1.5. Anticuerpos	67
3.1.6. Medios y tampones.....	68
3.1.7. Programas informáticos y bases de datos.....	70
3.1.7.1. Programas informáticos	70
3.1.7.2. Bases de datos	70
3.2. Métodos.....	70
3.2.1. Cultivo de <i>Trypanosoma brucei</i>	70
3.2.2. Congelación y descongelación de células	71
3.2.3. Clonación de vectores	71
3.2.4. Aislamiento de DNA genómico	72
3.2.5. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	72
3.2.6. Transformación de <i>E. coli</i>	72
3.2.7. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	72
3.2.8. Amplificación de DNA	73
3.2.9. Precipitación de ácidos nucleicos.....	73
3.2.10. Transfección estable de tripanosomas procíclicos	73
3.2.11. Expresión de proteínas etiquetadas en <i>T. brucei</i>	74
3.2.12. Ribointerferencia (RNAi).....	74

3.2.13. Preparación de lisados de proteínas	75
3.2.14. Inmunotransferencia.....	76
3.2.15. Inmunofluorescencia	76
3.2.16. Citometría de flujo	77
3.2.17. Purificación por afinidad en tándem (TAP) y espectrometría de masas	78
3.2.18. Ensayos de UV- <i>crosslinking</i> y polinucleótido quinasa (T4 PNK)	79
3.2.19. Inmunoprecipitación de RNA (RIP, <i>RNA- Immunoprecipitation</i>)	80
3.2.20. Extracción de RNA de tripanosomas en cultivo	82
3.2.21. Secuenciación masiva de RNA	82
3.2.22. RT-PCR cuantitativa	84
3.2.23. Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes ...	85
3.2.24. Ensayo de traducción	86
4. RESULTADOS	91
4.1. El silenciamiento de la expresión de la proteína ZC3H41 ocasiona graves defectos en el ciclo celular.	91
4.2. Identificación de proteínas asociadas a ZC3H41	96
4.3. Z41AP es esencial en tripanosomas procíclicos.....	102
4.4. ZC3H41 y Z41AP son proteínas de unión a RNA	105
4.5. El silenciamiento de la expresión de la proteína ZC3H41 produce pocos cambios en el transcriptoma de los tripanosomas procíclicos.....	107
4.6. El complejo ZC3H41/Z41AP se une a mRNAs que codifican proteínas ribosomales.	112
4.7. La asociación de ZC3H41/Z41AP con los mRNAs diana disminuye en condiciones estrés nutricional.	118
4.8. ZC3H41 y Z41AP están involucradas en la biogénesis del rRNA 5S.	120

ÍNDICE

4.9. El silenciamiento de la expresión de ZC3H41 o Z41AP produce una disminución global de la traducción.	122
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA.....	145
ANEXO I.....	179
ANEXO II	187

RESUMEN

Los tripanosomátidos son eucariotas unicelulares con un ciclo de vida complejo, que alterna entre el insecto vector y el hospedador mamífero. Para adaptarse a los diferentes ambientes que encuentra dentro de cada huésped, los parásitos se diferencian y sufren cambios bioquímicos y morfológicos gobernados por la expresión diferencial de genes propios de cada etapa. En estos organismos, la transcripción de la RNA polimerasa II parece ser constitutiva dentro de la misma unidad policistronica, por lo que el control de la expresión génica ocurre casi exclusivamente a través de mecanismos postranscripcionales.

En este contexto, las proteínas de unión a RNA (RBPs) constituyen uno de los principales mecanismos de regulación ya que son capaces de unirse a los RNA mensajeros diana y reclutar a otros factores implicados en mecanismos de procesamiento, localización, degradación o traducción, determinando así el destino de los mRNAs dentro de la célula.

Entre las RBPs se ha demostrado que las proteínas de dedo de zinc de tipo CCCH están implicadas en procesos celulares tan diversos como la diferenciación, la regulación del ciclo celular y la traducción. ZC3H41 es una proteína con un dominio de dedo de zinc de tipo CCCH esencial en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*, que ha sido descrita como un componente de gránulos de estrés nutricional y que es secretada en vesículas asociada al SL RNA. Sin embargo, el papel de esta proteína en el metabolismo del RNA sigue siendo desconocido.

En esta tesis doctoral hemos demostrado que el silenciamiento de la expresión de ZC3H41 condujo a alteraciones en el ciclo celular y a la aparición de parásitos con morfologías aberrantes. ZC3H41 se encontró

RESUMEN

asociada a una proteína esencial, a la que llamamos Z41AP, formando un heterodímero estable, y también a proteínas de unión a poli(A), PABP1 y PABP2, y al factor de inicio de la traducción eIF4E4. La identificación de los transcritos asociados a ZC3H41/Z41AP reveló que el complejo se encuentra asociado principalmente a mRNAs que codifican proteínas ribosomales. Además, observamos que la unión a los transcritos diana disminuye cuando el parásito es sometido a estrés nutricional. Finalmente, mostramos que el silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP produjo una acumulación de precursores de rRNA 5S y una disminución global de la traducción.

En resumen, los resultados de esta tesis doctoral indican que el complejo ZC3H41/Z41AP podría participar en el control del destino de los mRNAs que codifican proteínas ribosomales dentro del parásito, facilitando su asociación con el complejo PABP1/eIF4E4/eIF4G3 en respuesta al estado nutricional del parásito. Estas observaciones proporcionan una vía atractiva para explorar más a fondo cómo los tripanosomas son capaces de vincular la detección de señales ambientales con la regulación de la expresión génica.

ABREVIATURAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico o *DesoxirriboNucleic Acid*

dsRNA: RNA de doble cadena o *double strand RNA*

Kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

LSU: subunidad ribosomal grande o *Large ribosomal SubUnit*

mRNA: RNA mensajero o *messenger RNA*

ORF: Marcos abiertos de lectura u *Open Reading Frames*

pb: Pares de bases

PBS: Solución salina tamponada con fosfato o *Phosphate-Buffered Saline*

PTUs: Unidades de transcripción policistrónica o *Polycistronic Transcription Units*

RBP: Proteína de unión a RNA o *RNA Binding Protein*

RIP: Inmunoprecipitación de RNA o *RNA ImmunoPrecipitation*

RNA: Ácido ribonucleico o *RiboNucleic Acid*

RNAi: Ribointerferencia o *RNA interference*

RNP: Ribonucleoproteína o *RiboNucleoProtein*

RPM: Lecturas por millón de lecturas mapeadas o *Reads Per Million mapped reads*

rRNA: RNA ribosomal o *ribosomal RNA*

ABREVIATURAS

RT-PCR: Reverso transcripción y PCR o *Reverse Transcription PCR*

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida o *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

SL: *Spliced Leader*

SL RNA: RNA del *Spliced Leader*

snoRNAs: RNA pequeños nucleolares o *Small Nucleolar RNAs*

snRNAs: RNA pequeños nucleares o *Small Nuclear RNAs*

SSR: Región de cambio de cadena o *Strand Switch-Region*

SSU: Subunidad ribosomal pequeña o *Small ribosomal Subunit*

TAP: Purificación por afinidad en tándem o *Tandem Affinity Purification*

tRNA: RNA de transferencia o *transfer RNA*

UTR: Región no traducida o *UnTranslated Region*

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tripanosomiasis humana africana

1.1.1. Etiología y epidemiología

La tripanosomiasis humana africana (HAT, *Human African Trypanosomiasis*), también conocida como enfermedad del sueño, es una enfermedad tropical desatendida (NTD, *Neglected Tropical Disease*), que se encuentra en 36 países de África subsahariana. Es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma brucei* y transmitida por la mosca *tsetse* del género *Glossina*. Dos subespecies pueden infectar al humano; *T.b gambiense* desencadena una forma crónica de la enfermedad en 24 países de África occidental y central y representa el 98% de los casos notificados, mientras que *T.b rhodesiense* es el agente patógeno de la forma aguda en 13 países del este y sur de África. Por otro lado, *T. b brucei* solo afecta al ganado dando lugar a la tripanosomiasis animal africana o nagana, provocando importantes pérdidas económicas (Gao et al., 2020).

A principios del siglo XX, la enfermedad del sueño causaba una alta mortalidad en las poblaciones de todo el continente con un gran impacto socioeconómico. El último aumento en la transmisión de la enfermedad se registró a finales de la década de 1990, con más de 35.000 casos notificados anualmente en 1997 y 1998. En las últimas dos décadas, con el refuerzo de las actividades de control y vigilancia, el tratamiento de personas con infecciones detectadas y el control de los vectores, la prevalencia de la enfermedad se ha reducido drásticamente. Aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha notificado 663 casos en 2020, la enfermedad del sueño sigue siendo un problema de salud pública en regiones endémicas de África y países no endémicos como América del Norte y Europa hasta que se elimine por completo (Franco et al., 2022).

INTRODUCCIÓN

1.1.2. Fisiopatología y tratamiento

El ritmo y la duración de la progresión de la enfermedad son diferentes en las dos variantes de la enfermedad. *T. b. rhodesiense* suele causar una enfermedad aguda que, si no se trata, es probable que provoque la muerte del paciente en pocas semanas, mientras que la enfermedad causada por *T. b. gambiense* es típicamente una enfermedad más crónica que puede durar meses o incluso años.

La enfermedad del sueño se compone de dos etapas clínicas. Durante la primera etapa o etapa hemolinfática, los parásitos se multiplican y se diseminan por el torrente sanguíneo, ganglios y sistema linfático, órganos endocrinos y diferentes órganos sistémicos, como hígado, bazo y corazón. Los síntomas iniciales, como fiebre y dolor de cabeza pueden ser inespecíficos, lo que puede retrasar el diagnóstico clínico. A medida que los parásitos se diseminan, el paciente puede desarrollar linfadenopatía, anemia hemolítica, hepatomegalia y función hepática anormal, esplenomegalia, trastornos endocrinos, así como pericarditis. Una vez que los parásitos han cruzado la barrera hematoencefálica para entrar en el sistema nervioso central, se inicia la segunda etapa o meningoencefalítica, con una amplia variedad de signos y síntomas neurológicos como una alteración del ciclo sueño-vigilia, trastornos psiquiátricos y del comportamiento, y alteraciones neurológicas como temblores, dificultad para hablar, mielopatía y ataxia cerebelosa (Kennedy et al., 2019).

La enfermedad del sueño suele ser mortal sin un tratamiento adecuado. La terapia farmacológica actual se basa en unos pocos medicamentos, los cuales se desarrollaron hace muchos años y tienen un grado de toxicidad que es más elevado en el caso de los medicamentos

para la enfermedad en etapa tardía. El tratamiento dependerá de la subespecie de *T. brucei* y del estadio de la enfermedad. El tratamiento para la etapa temprana consiste en la administración intravenosa de pentamidina o suramina para la infección con *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* respectivamente. Para la etapa tardía, el tratamiento contra *T. b. gambiense* consiste en una terapia combinada de eflornitina intravenosa durante 10 días junto con nifurtimox oral durante 14 días. El único tratamiento actualmente disponible contra *T. b. rhodesiense* es el melarsoprol. Aunque es muy eficaz, el melarsoprol es altamente tóxico y provoca un síndrome encefalopático que es mortal en una de cada veinte personas que toman el fármaco (Kennedy et al., 2019).

Actualmente se están desarrollando estudios con nuevos fármacos prometedores. Recientemente se ha completado con éxito los ensayos clínicos con fexinidazol siendo una nueva opción de tratamiento segura, fácil de administrar y eficaz en todas las etapas de la infección contra *T. brucei gambiense* (Mesu et al., 2018; Mesu et al., 2021). Otro candidato a fármaco oral, es el acoziborol o SCYX-7158 (Jacobs et al., 2011) que se encuentra actualmente en ensayos de fase II/III en pacientes en África (Dickie et al., 2020).

Además del tratamiento de personas infectadas también es crucial para la eliminación de la enfermedad la detección de humanos portadores asintomáticos y reservorios animales y el desarrollo de medidas eficaces para el control del vector (Barrett, 2018).

INTRODUCCIÓN

1.2. Características generales de *T. brucei*

T. brucei pertenece a la familia *Trypanosomatidae* dentro del orden *Kinetoplastida* que comprende un grupo de protozoos definidos por la presencia de una única mitocondria que contiene una masa muy compacta de DNA llamada kinetoplasto. Los tripanosomátidos son parásitos que infectan a plantas, insectos y mamíferos como animales domésticos y humanos. Además de *T. brucei*, otros parásitos como *T. cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, y *Leishmania sp* que produce diversas formas de leishmaniasis, conforman este grupo (Stuart et al., 2008). Es probable que estos organismos se hayan ramificado muy temprano y hayan evolucionado de manera diferente a otros eucariotas bien estudiados, lo que puede explicar la gran cantidad de características peculiares que definen su biología (Stevens, 2008).

1.2.1. Ciclo de vida

T. brucei es un parásito extracelular cuyo ciclo de vida se desarrolla entre el vector artrópodo, la mosca *tse-tse*, y el hospedador mamífero (Figura 1). Dentro de cada hospedador, el parásito sufre cambios morfológicos y metabólicos como respuesta adaptativa al entorno.

El ciclo se inicia cuando a través de la picadura, la mosca infectada ingiere sangre e inyecta tripomastigotes metacíclicos en la piel del hospedador mamífero. Los tripanosomas pasan a la sangre y proliferan por el torrente sanguíneo como formas morfológicamente delgadas, también llamadas esbeltas (*slender*), que se duplican por fisión binaria. En el mamífero, el parásito sobrevive evadiendo la respuesta inmune del hospedador a través de un mecanismo conocido como variación antigénica

(McCulloch, 2004), que implica la expresión de glicoproteínas variables de superficie (VSG, *V*ariable *S*urface *G*lycoprotein) en la membrana del parásito, que cambian constantemente para asegurar así una infección crónica. Además, es importante señalar que estas formas *slender* emplean la glucosa como fuente de carbono para la obtención de ATP a través exclusivamente de la glucólisis (Smith et al., 2017). A medida que la densidad celular aumenta, las formas *slender* son reemplazadas por formas rechonchas no proliferativas o *stumpy*. Este proceso de cambio de una forma a otra se conoce como diferenciación y se desencadena a través de un mecanismo de *quorum sensing* en respuesta a oligopéptidos, que estimulan la vía de transducción de señales que conduce a la formación de formas *stumpy* (Tettey et al., 2022).

La forma *stumpy* está preadaptada a la vida en el intestino medio de la mosca *tse-tse*. La acumulación de formas no proliferativas tiene dos propósitos: limitar el aumento del número de parásitos y, por tanto, prolongar la supervivencia, y garantizar que los cambios morfológicos que se producen tras la transmisión a la mosca *tse-tse* puedan coordinarse con el reingreso en el ciclo celular (Smith et al., 2017).

Durante la ingesta de sangre de un huésped mamífero infectado, los parásitos pasan a la mosca y se establecen en el intestino medio diferenciándose a formas procíclicas, que se multiplican por fisión binaria. Estas formas procíclicas reemplazan la capa de VSG por una capa superficial menos densa compuesta de prociclinas (Roditi et al., 2002). Además, dado que la fuente principal de energía dentro de la mosca es la prolina, la generación de energía cambia a un sistema respiratorio basado en una mitocondria completamente activa (Smith et al., 2017). Finalmente, las formas procíclicas se dirigen a las glándulas salivares donde se

INTRODUCCIÓN

transforman en formas metacíclicas. Estas últimas tienen un ciclo celular detenido, vuelven a adquirir una cubierta de VSG y están preparadas para la transmisión a un nuevo huésped mamífero.

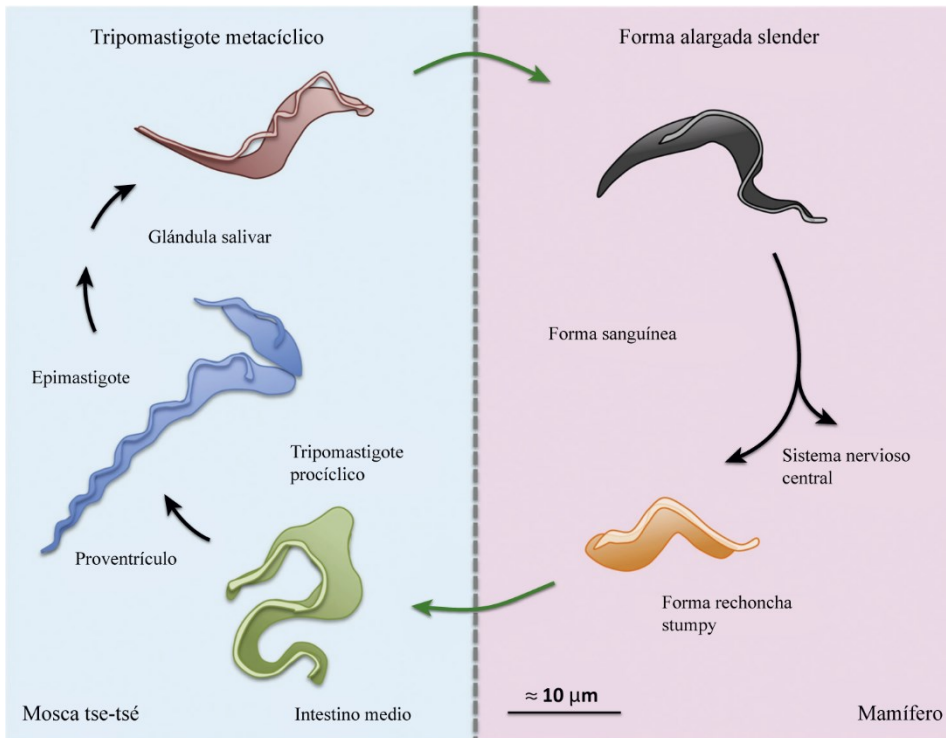


Figura 1. El ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. La infección en un hospedador mamífero se inicia cuando la picadura de una mosca *tse-tse* libera tripomastigotes metacíclicos que se diferencian a una forma proliferativa que se multiplica diseminándose por todo el cuerpo a través de los sistemas circulatorio y linfático. Los parásitos finalmente penetran en el endotelio de los vasos sanguíneos e invaden el sistema nervioso central. En el torrente sanguíneo, algunos parásitos se diferencian a una forma rechoncha no proliferativa. En la mosca *tse-tse*, la forma *stumpy* se diferencia a tripomastigotes procíclicos, que reanudan la división celular. El tripomastigote procíclico migra a través del intestino medio hacia las glándulas salivales del hospedador vector, donde los parásitos se diferencian primero a epimastigotes y finalmente a tripomastigotes metacíclicos no proliferativos preparados para la transmisión a un nuevo hospedador mamífero. Modificada de (Hochstetter et al., 2016).

1.2.2. Estructura celular

La forma de la célula es alargada, definida y mantenida por un citoesqueleto altamente polarizado de microtúbulos. Dentro de esta estructura, los orgánulos como el bolsillo flagelar, el flagelo, el kinetoplasto, la mitocondria y el núcleo, se encuentran en una sola copia y posicionados con precisión en el extremo posterior y en el centro de la célula (Figura 2).

En el extremo posterior de la célula se sitúa el bolsillo flagelar. Esta estructura es el punto de salida del flagelo, además del único sitio de endo- y exocitosis. La endocitosis es un proceso de gran importancia para las formas sanguíneas del parásito dado que la renovación de la cubierta de VSG se realiza a través de este proceso (Engstler et al., 2004).

La motilidad del tripanosoma depende de su único flagelo compuesto por un clásico axonema de microtúbulos de tipo 9+2 y una estructura adicional denominada varilla paraflagelar (PFR, *Paraflagellar Rod*). El flagelo sale del bolsillo flagelar desde una estructura conocida como cuerpo basal y se extiende por toda la superficie del parásito adherido a ella a través de una región conocida como zona de unión del flagelo (FAZ, *Flagellum Attachment Zone*) hasta alcanzar el polo anterior de la célula (Vaughan et al., 2003).

El cuerpo basal se encuentra unido al kinetoplasto a través de un complejo de unión compuesto por filamentos (TAC, *Tripartite Attachment Complex*) que atraviesa el citoplasma y ambas membranas mitocondriales (Ogbadoyi et al., 2003).

La mitocondria es una estructura única y alargada que se extiende desde la parte posterior a la anterior de la célula. En las formas

INTRODUCCIÓN

sanguíneas, la mitocondria es una estructura tubular simple desprovista de crestas. Esto refleja la ausencia de fosforilación oxidativa durante esta etapa, siendo la generación de energía dependiente de la glucólisis, que se lleva a cabo dentro de unos orgánulos especializados denominados glicosomas (Parsons, 2004). Sin embargo, la forma procíclica del parásito vive en un entorno pobre en glucosa dentro del insecto, por lo que la mitocondria se encuentra muy activa y depende de la fosforilación oxidativa para la producción de energía (Priest et al., 1994).

La mitocondria contiene el DNA mitocondrial que recibe el nombre de kinetoplasto y que está compuesto por dos clases de DNA circular: los maxicírculos (~50 copias/kinetoplasto) que codifican las subunidades de los complejos respiratorios y RNA ribosómicos, y los minicírculos (~10.000 copias/kinetoplasto) que codifican los RNA guía necesarios para la edición de los transcritos de los maxicírculos (Klingbeil et al., 2004).

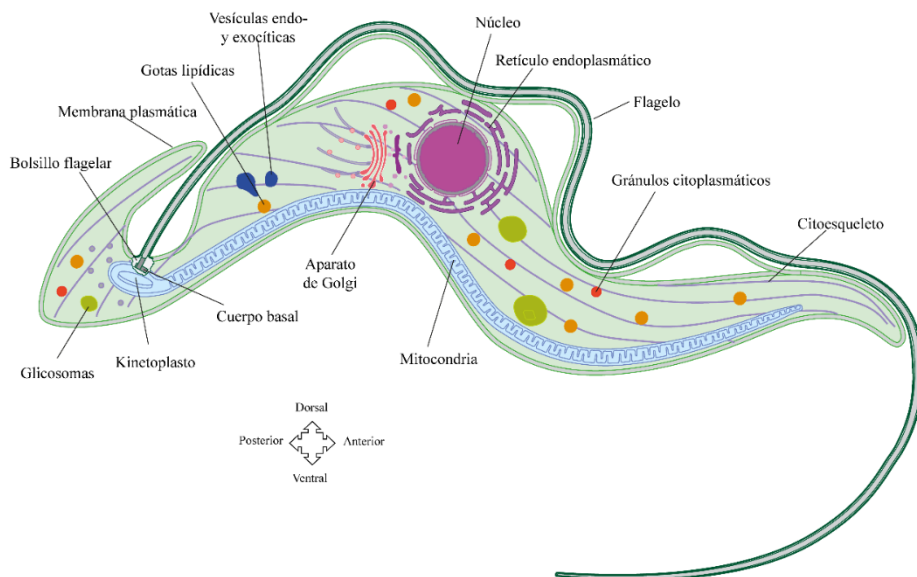


Figura 2. Estructura celular de *T. brucei*. Representación esquemática de los principales orgánulos y estructuras. Modificada de Trypanosoma icon by SwissBioPics.

1.2.3. Ciclo celular

El ciclo celular eucariótico típico consta de cuatro fases: G0/G1, S, G2 y M. Durante la primera fase G0/G1, la célula se prepara para entrar en una nueva ronda de replicación y división celular, asegurándose que la disponibilidad de nutrientes y el tamaño celular son apropiados para pasar a la fase S. El DNA se replica durante la fase S y, después de la fase G2, tiene lugar la segregación cromosómica mitótica y la citocinesis durante la fase M. Aunque el ciclo de división celular en *T. brucei* sigue ampliamente este esquema, posee características y complejidades únicas principalmente debido a que el kinetoplasto y los orgánulos de una sola copia, como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, flagelo y cuerpo basal, deben duplicarse y segregarse con precisión. Por lo tanto, la duplicación de orgánulos ocurre en un orden preciso y finamente controlado (Hammarton, 2007).

Los eventos que tienen lugar durante la fase G1 son la maduración y alargamiento de un cuerpo probasal junto al cuerpo basal existente para formar la zona de transición y luego el axonema del nuevo flagelo (Figura 3) (Lacomble et al., 2010).

Tanto el genoma nuclear como el del kinetoplasto se replican durante la fase S. La replicación del kinetoplasto ocurre antes de la replicación del DNA nuclear (Woodward et al., 1990). Además, durante la fase S el cuerpo basal se duplica y el flagelo antiguo se mantiene y se ensambla uno nuevo a partir del nuevo cuerpo basal (Figura 3). Las estructuras FAZ también se replican y se asocian al nuevo flagelo (Kohl et al., 1999). Comienza la síntesis *de novo* del Golgi a partir de una estructura bilobular que se replica durante esta etapa (He et al., 2004).

INTRODUCCIÓN

Durante la fase G2, se produce un reposicionamiento del nuevo cuerpo basal. La rotación y la migración del nuevo cuerpo basal hacia la porción posterior de la célula da como resultado la división de las bolsas flagelares y la segregación de los kinetoplastos (Lacomble et al., 2010). También se segregan las estructuras bilobulares; el Golgi antiguo se asocia con el lóbulo posterior y el Golgi nuevo se asocia con el lóbulo anterior de la estructura bilobular (He et al., 2004).

Durante la mitosis tiene lugar la formación del huso mitótico que se continúa con la segregación de los cromosomas y orgánulos (Figura 3). La mitosis en *T. brucei* es una mitosis cerrada; esto quiere decir que la envoltura nuclear permanece intacta y la mitosis se produce dentro del núcleo. Uno de los núcleos hijos se posiciona entre los dos kinetoplastos, asegurando la correcta partición de los orgánulos (Ogbadoyi et al., 2000).

La citocinesis es el paso final del ciclo celular durante el cual las dos células hijas se separan físicamente. La citocinesis en los tripanosomas parece ser diferente de la de otros eucariotas; la escisión no ocurre a través de un anillo contráctil de actino-miosina, sino que la citocinesis se inicia con un surco de escisión en el extremo anterior de la célula dividiendo a la célula en dos siguiendo el nuevo flagelo/FAZ como eje (Vaughan et al., 2003). Los microtúbulos recién sintetizados se integran en el antiguo conjunto de microtúbulos. Por lo tanto, el corsé de microtúbulos parece ser heredado por las dos células hijas de manera semiconservadora (Sherwin et al., 1989).

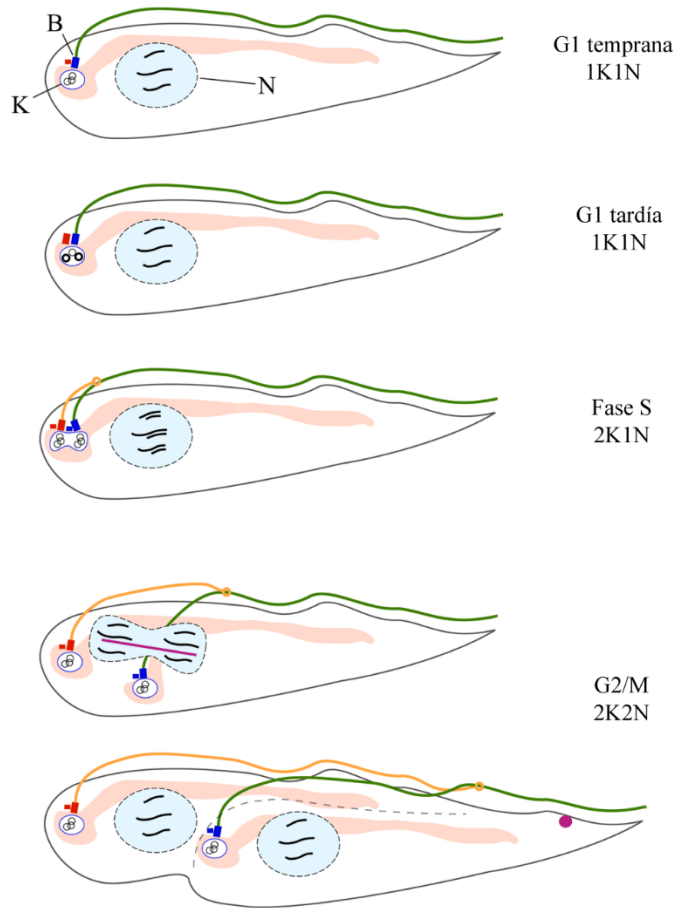


Figura 3. Principales eventos morfológicos del ciclo celular de la forma procíclica de *T. brucei*. K: el kinetoplasto. N: Núcleo. B: Cuerpo basal (rectángulo azul) y cuerpo probasal (rectángulo rojo). En rosa claro se representa la mitocondria. El flagelo antiguo se simboliza en verde, que emerge del extremo posterior de la célula. En la fase G1, el cuerpo probasal madura hasta convertirse en un nuevo cuerpo basal que se localizará en la base del nuevo flagelo. La replicación del kinetoplasto se inicia antes de la fase S nuclear. En la fase S, el nuevo flagelo (naranja) comienza a alargarse, anclado al antiguo flagelo, mientras que los kinetoplastos y los cuerpos basales se separan. Después de la replicación del DNA, se forma un huso mitótico (línea rosa) y las células entran en mitosis. Imagen modificada de (Archer et al., 2011).

INTRODUCCIÓN

La regulación del ciclo celular de *T. brucei* también posee características únicas e inusuales. Los tripanosomas parecen emplear tanto moléculas conservadas evolutivamente como específicas de tripanosomas para regular las diversas etapas de su ciclo celular. Los ortólogos de muchas proteínas quinasas conservadas, como las quinasas dependientes de ciclina (CDK), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las quinasas tipo Aurora y Polo, están presentes en *T. brucei*, aunque sus funciones a menudo son divergentes. Por otro lado, los tripanosomas han integrado reguladores únicos para compensar la ausencia de esas moléculas conservadas y, además, han desarrollado ciertas vías reguladoras del ciclo celular que son diferentes de su hospedador humano o distintas entre sus propias formas de ciclo de vida. (Li, 2012). Por ejemplo, la ciclina CYC6 es esencial durante la mitosis en *T. brucei*. Su ausencia genera células anucleadas con un solo kinetoplasto (denominadas zoides) en la forma procíclica del parásito, por lo que los tripanosomas pueden sufrir citocinesis sin haber completado la mitosis. Sin embargo, la ausencia de *CYC6* en la forma sanguínea impide la citocinesis, pero no la replicación y segregación de kinetoplastos, al observarse células con un solo núcleo, pero múltiples kinetoplastos (Hammarton et al., 2003).

1.2.4. Variación antigénica

Dentro del hospedador mamífero, *T. brucei* se diferencia a formas sanguíneas y expresa la glicoproteína variante de superficie (VSG) como principal antígeno de superficie. Esta VSG es altamente inmunogénica. Sin embargo, *T. brucei* expresa secuencialmente VSG inmunológicamente distintas, evadiendo así la respuesta inmunitaria del huésped. La variación antigénica es un mecanismo esencial que permite a *T. brucei* establecer infecciones a largo plazo.

T. brucei contiene más de 2.500 genes VSG y pseudogenes (Cross et al., 2014). La mayoría se localizan en regiones subteloméricas de los megacromosomas y se transcriben desde sitios de expresión (ES, Expression Sites) por la RNA polimerasa I (Günzl et al., 2003). *T. brucei* contiene ~20 ESs. Sin embargo, solo un ES se encuentra activo y expresa solo un tipo de VSG en la superficie celular del parásito en un momento dado. El cambio de una VSG por otra se puede producir mediante recombinación, al reemplazar un gen VSG por otro en el sitio activo, o mediante el silenciamiento transcripcional del ES activo con la activación simultánea de un ES inactivo, fenómeno conocido como cambio *in situ* (Horn, 2014).

1.3. Organización génica y transcripción en *T. brucei*

1.3.1. Organización génica

Los tripanosomas son organismos diploides cuyo DNA nuclear consiste en 11 pares de cromosomas megabásicos de 1-6 megabases de longitud, ~5 cromosomas intermedios (200-900 kilobases, kb) y unos 100 minicromosomas (50-150 kb). Los cromosomas megabásicos contienen la mayoría de los genes que codifican proteínas, y sus regiones subteloméricas albergan los genes para las VSGs. La secuencia de los minicromosomas consiste en una región central de 177 pares de bases repetidas en tándem seguida de repeticiones teloméricas; contienen genes VSG aumentando así el repertorio de estos genes en el parásito (Berriman et al., 2005).

Dentro de los cromosomas megabásicos los genes se organizan en grandes unidades de transcripción policistronica (*PTUs*, Polycistronic Transcription Units), que pueden tener más de 100 kb de longitud y que son transcritas por la RNA polimerasa II a partir de la misma cadena de

INTRODUCCIÓN

DNA. Estas unidades de transcripción contienen genes que codifican proteínas sin aparente relación funcional. Las regiones que separan dos PTUs vecinas ubicadas en cadenas opuestas se denominan regiones de cambio de cadena (SSR, *Strand Switch Regions*), y pueden ser divergentes asociadas al inicio de la transcripción, o convergentes relacionadas con el fin de la transcripción (Figura 4) (Siegel et al., 2009).

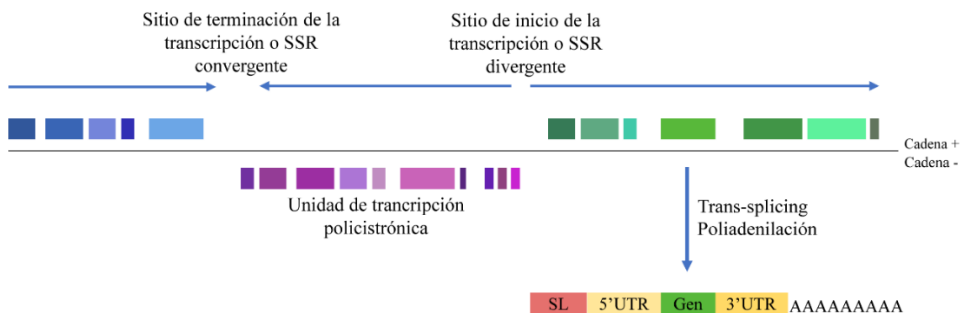


Figura 4. Transcripción policistrónica y procesamiento del mRNA. Los genes se organizan en unidades de transcripción policistrónica separadas por regiones de cambio de cadena (SSR). Tras el trans-splicing y la poliadenilación el mRNA maduro contiene el *spliced leader* (SL) en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3'. Basado en (Siegel et al., 2011).

1.3.2. RNA polimerasas

T. brucei posee tres RNA polimerasas cuyas estructuras y funciones se encuentran conservadas con respecto a las RNA polimerasas de otros eucariotas.

La RNA polimerasa I es la encargada de transcribir de los genes que codifican los RNA ribosómicos (rRNA) 18S, 5.8S y 28S. Además, también transcribe los genes que codifican para las proteínas de superficie tanto de la forma sanguínea (VSG) como de la forma procíclica del parásito (EP y GPEET) (Günzl et al., 2003). Los genes de las VSGs,

prociclinas y rRNAs contienen secuencias promotoras. Además, se ha demostrado que la eficiencia de transcripción de la RNA polimerasa I es de al menos 10 veces superior a la de RNA polimerasa II. Esto es importante para obtener niveles adecuados de mRNA a partir de un único gen VSG activo (Biebinger et al., 1996).

La RNA polimerasa II transcribe los RNA mensajeros mientras que la RNA polimerasa III sintetiza pequeñas moléculas de RNA esenciales como los RNA de transferencia (tRNA), el rRNA 5S, el RNA 7SL y los RNA pequeños nucleares ricos en uracilo (snRNA) (Fantoni et al., 1994).

1.3.3. Transcripción

Como se ha descrito anteriormente, en tripanosomátidos los genes se organizan en largas unidades que se transcriben como un único policistrón y, a diferencia de los operones de procariontes, no parecen estar ligados funcionalmente (Berriman et al., 2005).

En los eucariotes, gran parte de la regulación de la expresión génica se lleva a cabo a nivel transcripcional donde los promotores y factores de regulación asociados indican cuándo y qué genes son transcritos. Sin embargo, en tripanosomátidos, la transcripción de la RNA polimerasa II parece ser constitutiva dentro de la misma unidad policistrónica, por lo que el control de la expresión génica se logra casi exclusivamente mediante mecanismos postranscripcionales (D'Orso et al., 2003).

Poco se sabe sobre el inicio y la terminación de la transcripción. Ensayos de *run-on* han demostrado que la transcripción de la RNA polimerasa II comienza en regiones de cambio de cadena o SSR

INTRODUCCIÓN

divergentes y termina en SSR convergentes o en la vecindad de los genes transcritos por diferentes RNA polimerasas (Figura 4) (Martínez Calvillo et al., 2003; Martínez-Calvillo et al., 2004).

Los sitios de inicio de la transcripción no parecen contener promotores típicos de RNA polimerasa II, con la excepción del promotor SL, ni factores reguladores de la transcripción. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, se ha demostrado que estas zonas de inicio de la transcripción están enriquecidas en histonas variantes H2AZ, H2BV y modificaciones de histonas H4K10ac y H3K4ac (Siegel et al., 2009; Wright et al., 2010), tienen una estructura de cromatina abierta y contienen secuencias ricas en GT capaces de iniciar la transcripción de genes y provocar la acumulación de H2AZ (Wedel et al., 2017; Cordon-Obras et al., 2022).

La transcripción de la RNA polimerasa II termina en las regiones convergentes, justo antes de los genes que codifican los tRNAs o de los genes transcritos por RNA polimerasa I. Estas regiones de terminación están enriquecidas en histonas variantes H3V y H4V o una modificación específica llamada base J. La base J desempeña un papel en la terminación en la forma sanguínea de *T. brucei*, pero no en la procíclica donde está ausente (Siegel et al., 2009; Reynolds et al., 2014). Por tanto, parece ser que las unidades de transcripción policistrónicas están delimitadas por distintas conformaciones de la cromatina y la transcripción de la RNA polimerasa II parece estar regulada por la presencia de diferentes histonas y modificaciones de estas. Sin embargo, nuestro laboratorio recientemente ha demostrado que estas marcas no parecen ser suficientes para la terminación de la transcripción, sino que adicionalmente existen mecanismos postranscripcionales de vigilancia que degradan los mRNAs

antisentido que provienen de estas regiones de terminación y de otras regiones que se encuentran silenciadas (Gómez-Liñán et al., 2022).

1.3.4. Maduración del mRNA

Los transcritos necesitan ser procesados para dar lugar a RNA mensajeros individuales, maduros y estables, mediante dos procesos acoplados, el *trans-splicing* y la poliadenilación (Figura 4 y Figura 5). El *trans-splicing* consiste en la adición de una secuencia de 39 nucleótidos llamada *spliced leader* (SL) en el extremo 5' de cada cistrón. El sitio aceptor del *trans-splicing* es un nucleótido AG que se encuentra precedido de una región polipirimidínica (Benz et al., 2005). Como consecuencia, todos los mRNAs en tripanosomas comienzan por los mismos 39 nucleótidos correspondientes al SL. Además, el SL proporciona una estructura de caperuza denominada *cap4*, requerida para la traducción y la protección de los mensajeros de la degradación. La estructura *cap4* de los tripanosomas es muy inusual; está hipermetilada de una manera única y es la estructura de tapa más modificada que se conoce en las células eucariotas. Además del residuo m⁷GTP convencional unido al primer nucleótido, los siguientes cuatro nucleótidos también se encuentran metilados (Bangs et al., 1992). A diferencia de lo que ocurre en los demás eucariotas, en tripanosomas la estructura *cap4* origina mRNAs traducibles que pueden ser transcritos por otras polimerasas, como la RNA polimerasa I e incluso la polimerasa T7 de bacteriófagos (Wirtz et al., 1994).

El proceso de poliadenilación consiste en la adición de la cola de poli(A) en el extremo 3' del mRNA. El *trans-splicing* y la poliadenilación se encuentran acoplados espacial y temporalmente. La poliadenilación de un cistrón ocurre a una distancia fija (100-300 nucleótidos) aguas arriba de la señal de *trans-splicing* del gen adyacente (Schurch et al., 1994).

INTRODUCCIÓN

Cuando el procesamiento falla, se producen precursores de mRNA di- u oligocistrónicos y poliadenilados que se acumulan en el núcleo y escapan al citoplasma. Dichos mRNAs parcialmente procesados son destruidos por el complejo RNA exosoma (Figura 5) (Kramer et al., 2016).

1.3.5. Transporte de mRNA

La transcripción y la exportación nuclear están estrechamente conectadas en *T. brucei*. Durante la transcripción y el procesamiento, cada molécula de mRNA se asocia con un conjunto de proteínas que “marcan” al mRNA y lo dirigen hacia la degradación o facilitan su transporte desde núcleo al citoplasma (Figura 5) (Goos et al., 2019).

Mex67 y Mtr2 son receptores de exportación nuclear que están involucrados en el transporte de mRNAs, subunidades ribosomales y tRNAs a través del complejo del poro nuclear. En *T. brucei*, se han identificado ortólogos de Mex67 (TbMex67) y Mtr2 (TbMtr2) y se ha demostrado que participan en la exportación de mRNAs. Sin embargo, TbMex67 es estructuralmente distinto en comparación con otros ortólogos. En su extremo amino-terminal, TbMex67 contiene un motivo de dedo de zinc en lugar del motivo de reconocimiento de RNA (RRM) presente en otros ortólogos. Se ha demostrado que el motivo de dedo de zinc es esencial en la exportación de mRNAs en tripanosomas (Dostalova et al., 2013).

En células animales, existe el llamado *exon junction complex* (EJC) que se une al mRNA a unos 20 a 24 nucleótidos aguas arriba de la unión exón-exón. El núcleo de EJC lo forman cuatro proteínas: Mago, Y14, eIF4AIII y Btz. En tripanosomas se ha encontrado un homólogo a Mago conservado y una proteína Y14 divergente que forman un

heterodímero estable y que copurifica *in vivo* con una proteína que contiene un dominio NTF2, típicamente involucrado en el transporte de mRNAs (Boehm et al., 2016).

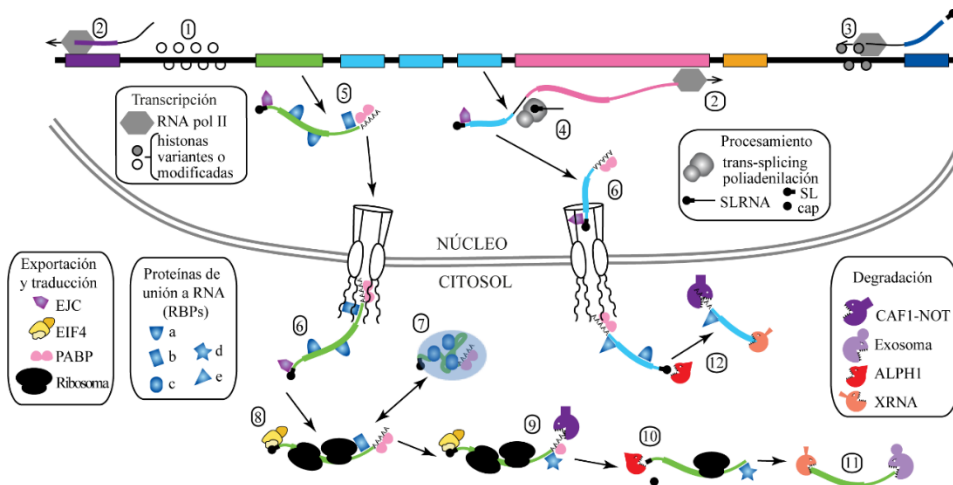


Figura 5. Expresión génica en tripanosomátidos y mecanismo de acción de las RBPs en el metabolismo del RNA. 1: Histonas variantes o modificadas en una región de inicio de RNA polimerasa II. 2: Elongación de la RNA polimerasa II. 3: Terminación de la RNA polimerasa II. 4: Trans-splicing y poliadenilación. 5: RBPs nucleares interactúan con sus mRNA diana tan pronto como comienzan a ser transcritos por la RNA polimerasa II y modulan la estabilización del mRNA al unirse a su 3'-UTR (b) y los procesos de exportación nuclear (a). 6: Exportación de un mRNA maduro con la proteína de unión a poli(A) (PABP) y el *exon junction complex* (EJC) y RBPs. 7: Unión por una proteína de unión a RNA silenciadora o agregante (c) y formación de gránulo de RNA. 8: Unión de eIF4E, eIF4G y eIF4A, y traducción. 9: La proteína (b) se reemplaza por una proteína de unión a RNA desestabilizadora (d) y comienza la deadenilación. 10: Eliminación de cap4 por ALPH1. 11: Degradación por XRNA y el exosoma. 12: Vía de degradación rápida: eliminación de cap4 promovida por la proteína (e). Modificado de (Clayton, 2019).

1.4. Regulación de la expresión génica en *T. brucei*

Como se mencionó anteriormente, *T. brucei* tiene un ciclo de vida complejo, alternando entre el insecto vector y el hospedador mamífero.

INTRODUCCIÓN

Para adaptarse a los diferentes ambientes que encuentra dentro de cada huésped (cambios de temperatura, pH, nutrientes y defensas), los tripanosomátidos se diferencian y sufren cambios bioquímicos y morfológicos orquestados por la expresión diferencial de genes específicos de cada etapa. De hecho, los análisis globales del transcriptoma realizados en *T. brucei* han demostrado ~5 % de los mRNA se regulan de manera diferencial, no solo entre las formas sanguíneas y procíclicas del parásito, sino también cuando se comparan las células que se dividen con las no proliferativas dentro del mismo huésped (Jensen et al., 2009; Siegel et al., 2010; Naguleswaran et al., 2018)

En los tripanosomátidos, el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II no está controlado a nivel de genes individuales. Como la gran mayoría de los mRNA se producen a la misma velocidad, los tripanosomátidos tienen que depender de mecanismos postranscripcionales para regular la abundancia de los transcritos.

El hecho de que el *trans-splicing* y la poliadenilación sean procesos acoplados más la observación de que muchos de los genes cotranscritos son funcionalmente diferentes, limita la importancia del procesamiento del RNA en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo. La evidencia experimental sugiere que los principales puntos de control de la expresión génica se encuentran a niveles de recambio y traducción del mRNA.

1.4.1. Degradación del mRNA

La abundancia de un mRNA en una célula está determinada no solo por su tasa de síntesis y procesamiento, sino también por su tasa de degradación. Para la mayoría de los mRNAs de eucariotas, la degradación

se inicia mediante la eliminación de la cola poli(A), proceso conocido como deadenilación. En *T. brucei*, se conocen tres tipos diferentes de deadenilasas: los complejos formados por CAF1-NOT y PAN2-PAN3 y la poli(A) ribonucleasa (PARN). El acortamiento de la cola de poli(A) dará como resultado la pérdida de la proteína de unión a poli(A), exponiendo al mRNA a una mayor degradación. Tras la deadenilación, la fosfatasa ALPH1 elimina el *cap4* (Kramer, 2017). El mRNA se somete luego a la degradación 5'–3' por la exonucleasa XRNA y/o la degradación 3'–5' por el exosoma (Figura 5) (Fadda et al., 2013).

1.4.2. Proteínas de unión a RNA

La regulación postranscripcional implica principalmente la interacción entre un elemento regulador en *cis* ubicado generalmente dentro de la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA, y un elemento que actúa en *trans*, que suele ser una proteína de unión a RNA (RBP, *RNA Binding Protein*). Las RBPs se unen por tanto a los mRNA diana, formando una partícula ribonucleoproteica mensajera (mRNP, *messenger Ribonucleoprotein Particle*), reclutando a otros factores implicados en mecanismos de procesamiento, localización, estabilidad y degradación o traducción, determinando así el destino del mRNA dentro de la célula (Romaniuk et al., 2016).

El análisis global del genoma de *T. brucei* ha revelado la existencia de un gran número de proteínas con dominios de unión a RNA conservados; sin embargo, solo unas pocas han sido caracterizadas funcionalmente. El desarrollo en la forma sanguínea del parásito de un método simple para la caracterización de nuevas proteínas que se unen directamente al mRNA, ha permitido la identificación de nuevos

INTRODUCCIÓN

reguladores con capacidad para activar o reprimir la expresión de un mRNA reportero (Erben et al., 2014; Lueong et al., 2016).

Las RBPs se clasifican en diferentes grupos en función de la presencia de distintos dominios de unión al RNA, siendo el motivo de reconocimiento de RNA (RRM, *RNA Recognition Motif*), el dominio de dedo de zinc CCCH y el dominio Pumilio los más relevantes que se encuentran en las RBPs de tripanosomátidos (Romaniuk et al., 2016).

1.4.2.1. Proteínas con dominios de dedos de zinc tipo CCCH

Se encuentran definidas por el motivo de dedos de zinc CX₄₋₁₅-CX₄₋₆-CX₃-H. Se unen casi exclusivamente a RNA monocatenario y desempeñan funciones reguladoras en todos los procesos del metabolismo del RNA. Entre las mejor estudiadas están las proteínas de la familia TIS11, siendo la mejor caracterizada la proteína de mamífero tritetraprolina (TTP). Las proteínas TIS11 se unen a elementos ricos en AU en las regiones 3'-UTR de sus mRNA diana, mediando su degradación en la mayoría de los casos (Kramer et al., 2010).

El genoma de *T. brucei* codifica 48 proteínas CCCH. La gran mayoría no parecen tener homólogos en otros eucariotas; algunas tienen similitudes que están restringidas solo a dominios conservados (Kramer et al., 2010). Se sabe que algunas de estas proteínas están involucradas en la regulación de la diferenciación, el ciclo celular, el procesamiento del rRNA, el transporte nucleocitoplasmático y la respuesta a estrés.

La familia de proteínas TbZFP1, TbZFP2 y TbZFP3 regulan la diferenciación del parásito. TbZFP1, es importante en la forma sanguínea para el correcto reposicionamiento del kinetoplasto desde el extremo

posterior de la célula hasta una posición intermedia entre el núcleo y la parte posterior (Hendriks et al., 2005). El silenciamiento de TbZFP2 compromete la capacidad de los parásitos a diferenciarse a la forma procíclica y genera una extensión de los microtúbulos del citoesqueleto en el extremo posterior de la célula cuando se sobreexpresa en la etapa procíclica (Hendriks et al., 2001). TbZFP3 se asocia con la región 3'-UTR del gen de la prociclina *EPI* y su sobreexpresión da como resultado una mayor diferenciación de formas sanguíneas a formas procíclicas (Paterou et al., 2006; Walrad et al., 2009).

La inhibición de TbZC3H5 o TbZC3H22 provoca acumulación de células incapaces de completar el ciclo celular. Concretamente, la ausencia de TbZC3H5 ocasiona un aumento en la proporción de células en fase G2/M incapaces de completar la citocinesis (Bajak et al., 2020), mientras que la falta de TbZC3H22 conduce a una regulación negativa de mRNAs que codifican numerosas proteínas involucradas en la replicación del DNA (Erben et al., 2021).

TbZC3H20 y TbZC3H21 son más abundantes en la forma procíclica que en la forma sanguínea de *T. brucei* y son capaces de activar la expresión de enzimas mitocondriales y proteínas de superficie procíclicas a través del reclutamiento de MKT1. MKT1 forma parte de un complejo proteico que estabiliza los mRNA y mejora la traducción (Liu et al., 2020). De manera similar, TbZC3H28 es otra RBP que forma un complejo con MKT1, uniéndose y estabilizando mRNAs largos mal traducidos (Bishola et al., 2022).

En respuesta a choque térmico, TbZC3H11 se une específicamente a repeticiones (UAA)_n en las regiones 3'-UTR de los mRNA que codifican las chaperonas requeridas para el plegamiento de proteínas recién

INTRODUCCIÓN

sintetizadas, favoreciendo su estabilidad y traducción a través de la interacción con MKT1 en ambas formas del parásito (Droll et al., 2013; Singh et al., 2014).

TbZC3H30 y TbZC3H32 son dos RBPs cuya unión a un mRNA provoca la degradación del mismo (Chakraborty et al., 2018; Klein et al., 2017). Además, las células que carecen de ZC3H30 resultan ser más susceptibles que las de tipo silvestre a estrés por choque térmico y nutricional y tratamientos con DTT, arsenito o etanol.

1.4.2.2. Teoría de los operones o regulones postranscripcionales

Diversas investigaciones han demostrado que las RBPs no se unen aleatoriamente a mRNAs individuales, sino que se asocian con subconjuntos específicos de mRNAs que codifican componentes del mismo complejo proteico o implicados en un mismo proceso celular. Estas observaciones han dado lugar a la hipótesis de la existencia en eucariotas de 'operones o regulones postranscripcionales', mediante los cuales las RBPs individuales podrían regular el destino de múltiples mRNAs de manera coordinada (Keene, 2007). Esta aparente coordinación, especialmente a nivel de estabilidad y traducción del mRNA permite a las células responder de una forma rápida a las señales ambientales.

Los genes de los tripanosomas también forman regulones postranscripcionales, observándose que muchos conjuntos de mRNAs funcionalmente relacionados muestran patrones de regulación casi idénticos durante la diferenciación de la forma sanguínea a la forma procíclica del parásito (Queiroz et al., 2009). En algunos casos, se han definido con precisión elementos que actúan en *cis* dentro de las regiones

3'-UTR, necesarios y suficientes para conferir regulación. Por ejemplo, se han encontrado elementos ricos en U (URE) en las regiones 3'-UTR de varios transcritos regulados durante el desarrollo en *T. brucei*. Es el caso del mRNA de la fosfoglicerato quinasa *PGK β* y el mRNA de la prociclina *EPI*, que contienen un elemento regulador rico en U que estimula la degradación del mRNA en las formas sanguíneas (Quijada et al., 2002). Estos elementos parecen ser estructural y funcionalmente similares a los elementos ricos en AU de clase III (ARE) que se encuentran en varios mRNAs de protooncogenes y citoquinas inflamatorias presentes en eucariotas superiores que afectan a la estabilidad del mensajero al promover la deadenilación (Haile et al., 2007).

Otros ejemplos de elementos reguladores son un elemento de secuencia de RNA de 34 nucleótidos que contribuye al silenciamiento del gen *ESAG9* en las formas *slender*, y que actúa positivamente activando la expresión génica en formas *stumpy* (Monk et al., 2013) o el elemento en *cis* tipo tallo-lazo en la región 3'-UTR del gen *NT8* necesario para la regulación de la expresión del gen en respuesta a los niveles externos de purina (Fernández-Moya et al., 2014).

Algunas RBPs caracterizadas que se asocian con un subconjunto de mRNAs que codifican proteínas funcionalmente relacionadas son por ejemplo DRBD3 que se asocia a mRNAs que codifican proteínas de membrana (Fernández-Moya et al., 2012) o TbPUF9 que se une a transcritos regulados en el ciclo celular (Archer et al., 2009).

1.4.2.3. Reclutamiento de mRNA en gránulos citoplasmáticos

Uno de los niveles de regulación postranscripcional de la expresión génica se produce a través de la localización dinámica de los mRNAs en diferentes compartimentos del citoplasma. Algunos de estos compartimentos aparecen como gránulos de ribonucleoproteína, que son estructuras dinámicas de autoensamblaje que albergan mRNAs no traducidos y proteínas que regulan su destino.

Existen muchos tipos diferentes de gránulos de RNA en todo el reino eucariota y el conjunto de gránulos presentes depende del organismo, la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales. Entre los gránulos mejor estudiados se encuentran los cuerpos de procesamiento o cuerpos P y los gránulos de estrés. Los cuerpos P son estructuras altamente dinámicas que están presentes de forma constitutiva en todas las células. Están enriquecidos en proteínas involucradas en la degradación del mRNA, pero aún no está claro si funcionan en este proceso. Los gránulos de estrés contienen complejos de inicio de la traducción estancados y en algunos casos, subunidades ribosomales pequeñas. Una de las funciones propuestas de este tipo de gránulos es almacenar mRNAs durante el estrés celular. Los cuerpos P y los gránulos de estrés interactúan entre sí y también se encuentran en estrecha asociación con la traducción. Los inhibidores de la elongación de la traducción, como la cicloheximida, estabilizan los polisomas y provocan la disociación de los gránulos, mientras que otros inhibidores como la puromicina, desestabilizan los polisomas y promueven el ensamblaje de los gránulos (Balagopal et al., 2009).

La necesidad de regular estrictamente la expresión génica es igualmente importante para la progresión del ciclo de vida de los protozoos patógenos y, al igual que en otros eucariotas, los gránulos RNP están involucrados. Los parásitos con múltiples huéspedes y/o etapas de desarrollo dependen del almacenamiento de mRNAs para sobrevivir a latencias y situaciones de estrés o para estar preparados para la rápida traducción de mRNAs que se necesitan de inmediato en la siguiente etapa del ciclo de vida. Se han descrito cuatro tipos diferentes de gránulos de RNP en *T. brucei*: gránulos similares a los cuerpos P, gránulos de estrés nutricional, gránulos de estrés por choque térmico y gránulos de periferia nuclear (NPG) (Kramer, 2014).

Al igual que en otros eucariotas, los cuerpos P están presentes de manera constitutiva en los tripanosomas. Aumentan de tamaño cuando los polisomas se disocian, por ejemplo, tras el tratamiento con puromicina, lo que indica que están en equilibrio con los polisomas en traducción. Las proteínas que se han identificado en los gránulos similares a los cuerpos P de tripanosoma son: la helicasa DEAD box de RNA DHH1 (Cassola et al., 2007; Kramer et al., 2008), la proteína del dominio Lsm SCD6 (Kruger et al., 2013), la deadenilasa CAF1 (Kramer et al., 2012), la exonucleasa XRNA (Cassola et al., 2007; Kramer et al., 2008), y el factor de inicio de la traducción eIF4E1 (Kramer et al., 2012). Aunque en general contienen componentes similares a los cuerpos P de levadura o mamíferos, todavía no se han identificado ortólogos de las enzimas encargadas de eliminar el *cap4* tales como DCP1/2 y EDC3. El complejo citoplasmático Lsm1-7, un componente central de los cuerpos P en otros eucariotas, también está ausente. En cambio, SCD6 es esencial para la formación de cuerpos P en *T. brucei* (Kramer et al., 2012; Kruger et al., 2013).

INTRODUCCIÓN

Los gránulos de estrés nutricional se identificaron por primera vez en *T. brucei* mediante la incubación de tripanosomas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) libre de cualquier fuente de carbono y también *in vivo* en la etapa del insecto vector en *T. cruzi* (Cassola et al., 2007). Estos gránulos se asemejan a los cuerpos P en forma y localización citoplasmática, pero son más grandes en tamaño y número y contienen proteínas adicionales. Al recuperarse del estrés, los mRNAs se liberan de los gránulos, por lo que es probable que desempeñen una función de almacenamiento y estabilización de mRNAs durante estrés nutricional. El desarrollo de un método excelente para aislar gránulos de estrés nutricional en *T. brucei* (Fritz et al., 2015), ha permitido identificar multitud de proteínas que conforman este tipo de gránulos (Figura 6). Entre ellas, destacan principalmente proteínas de unión al RNA como RBP3, 4, 5a, 6b (Cassola et al., 2007), DRBD3 (Fernandez-Moya et al., 2012) y ALBA 1–4 (Mani et al., 2011), proteínas de unión a motivos de RNA ricos en uridina UBP1-2 (Cassola et al., 2007), factores de inicio de la traducción como eIF4E1-3 (Cassola et al., 2007; Kramer et al., 2013), las proteínas de unión a poli(A) PABP1 y PABP2 (Cassola et al., 2007; Kramer et al., 2013), y otras proteínas como la exonucleasa XRNA (Cassola et al., 2007), MKT1 y PBP1 (Singh et al., 2014). En cuanto al contenido de RNA, a diferencia de los gránulos de estrés de mamíferos, los mRNAs que codifican proteínas ribosomales se encuentran completamente excluidos en este tipo de gránulos en tripanosomas (Fritz et al., 2015).

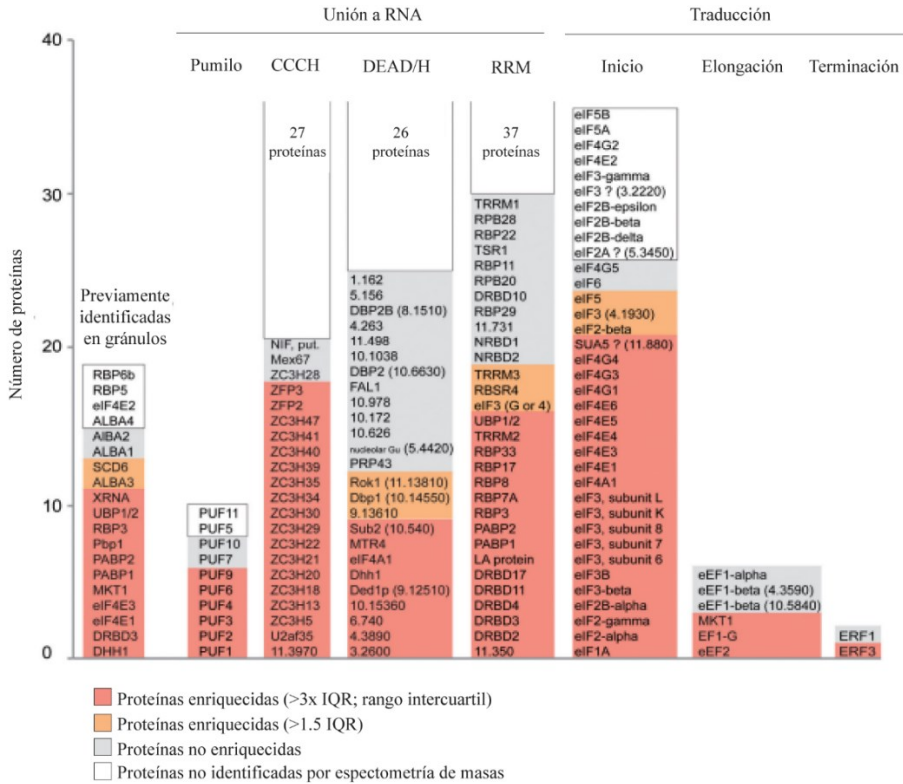


Figura 6. Proteínas enriquecidas en gránulos de estrés nutricional. Modificado de (Fritz et al., 2015).

Los gránulos de estrés por choque térmico se definieron originalmente como gránulos que se forman en respuesta a choque térmico severo (41°C) en cultivos de formas procíclicas de *T. brucei*. El choque térmico provoca una rápida disociación de los polisomas, así como una disminución en los niveles de la mayoría de los mRNAs causada, en parte, por un aumento de la degradación. La respuesta a choque térmico provoca un aumento en el número y tamaño de los cuerpos P, pero también la localización de varias proteínas en al menos dos poblaciones diferentes de gránulos. Estos son los gránulos de estrés por choque térmico situados en la periferia celular que contienen muchas de las proteínas implicadas en el inicio de la traducción y la proteína de unión a poli(A) PABP1, y la

INTRODUCCIÓN

relocalización de la exonucleasa XRNA en un foco situado en el polo posterior de la célula. (Kramer et al., 2008).

La inhibición del *trans-splicing* y la consiguiente acumulación de mRNAs procesados de forma incompleta provoca la redistribución de un conjunto de proteínas involucradas en el metabolismo del RNA a gránulos situados cerca de la periferia del núcleo (*nuclear periphery granules*, NPG). Este tipo de gránulos se componen de muchas de las proteínas presentes en los cuerpos P, además de PABP2 y VASA, una RNA helicasa homóloga a una RNA helicasa presente en gránulos germinales perinucleares de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. Los gránulos de la periferia nuclear difieren de los cuerpos P porque su presencia depende de la transcripción activa y no se ven afectados por la cicloheximida. Tienen la función de impedir que los mRNAs procesados de forma incompleta salgan al citosol, actuando como un sistema de control de calidad de los mRNAs recién sintetizados (Kramer et al., 2012).

1.5. Biogénesis del ribosoma

La síntesis de proteínas es un proceso esencial en todas las células. Los ribosomas son grandes complejos de ribonucleoproteínas responsables de este proceso. Al igual que en otros organismos eucariotas, los ribosomas de *T. brucei* están constituidos por dos subunidades; la subunidad pequeña 40S (*SSU*, *Small Subunit*) formada por el rRNA 18S y 33 proteínas ribosomales diferentes, y la subunidad grande 60S (*LSU*, *Large Subunit*,) que consta de tres moléculas de rRNA, 28S, 5.8S y 5S, así como 47 proteínas ribosomales asociadas. Mientras que los rRNAs realizan la función catalítica de síntesis de proteínas, las proteínas ribosomales funcionan principalmente para mantener la integridad

estructural del ribosoma y estabilizar las interacciones entre dominios y la unión con otros factores asociados (Martínez-Calvillo et al., 2019).

Los análisis de microscopía crioelectrónica indican que la arquitectura tridimensional general de los ribosomas de *T. brucei* es similar a la de los ribosomas de *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, existen algunas características estructurales distintivas en ambas subunidades. Por ejemplo, la SSU y la LSU de estos parásitos son más grandes que sus homólogos de levadura debido a la presencia de segmentos de expansión más grandes, así como la aparición de varios segmentos de expansión específicos de tripanosomátidos. Además, las proteínas ribosomales asociadas contienen grandes extensiones de aminoácidos, principalmente en los extremos N- o C-terminal, que están ausentes en los ortólogos de *S. cerevisiae*. Estas características permiten la interacción con nuevas proteínas ribosomales y factores específicos que regulan el proceso de traducción en tripanosomas (Hashem et al., 2013).

El proceso de biogénesis de los ribosomas comienza en el nucleolo y termina en el citoplasma. Es un proceso extremadamente complejo que implica la acción combinada de proteínas que participan en la maduración, procesamiento de los rRNAs, transporte de los precursores a través de diferentes compartimentos celulares y el ensamblaje de un ribosoma competente para la traducción (Umaer et al., 2014).

1.5.1. Organización génica y procesamiento de los rRNA 18S, 5.8S y 28S

Los genes ribosomales que codifican el rRNA 18S, 5.8S y 28S en *T. brucei* se organizan, al igual que en otros organismos eucariotas, como unidades de repetición en tándem separadas por espaciadores intergénicos.

INTRODUCCIÓN

Entre los diferentes eucariotas, el número de repeticiones fluctúa desde ~100 hasta más de 10 000; sin embargo, *T. brucei* posee solo de 15 a 20 repeticiones (Martínez-Calvillo et al., 2019).

Cada unidad de repetición se compone de una secuencia 5'-ETS / 18S / ITS-1 / 5.8S / ITS-2 / 28S / ETS-3' flanqueada por secuencias espaciadoras externas (ETS, *External Transcribed Spacer*). Además, los genes se encuentran separados por secuencias espaciadoras internas (ITS, *Internal Transcribed Spacer*). Esta secuencia se transcribe en el nucleolo como un solo transcrito primario grande por la RNA polimerasa I. El procesamiento de este pre-rRNA se produce mediante la eliminación de los espaciadores internos y externos dando lugar a los rRNA maduros 18S, 5.8S, y 28S (Campbell et al. 1987; Umaer et al., 2014).

Sin embargo, aunque los principales eventos de procesamiento y maduración del ribosoma están bastante conservados, una de las diferencias notables en *T. brucei* es el procesamiento adicional del rRNA 28S. Este rRNA posee ITSs adicionales en su secuencia interna cuya eliminación dará lugar a seis fragmentos estables de RNA: dos fragmentos grandes de aproximadamente 1900 y 1600 nucleótidos (LSUa y LSUb, respectivamente) y cuatro rRNA pequeños (SR1, SR2, SR4 y SR6) de aproximadamente 70 a 220 nucleótidos (Campbell et al. 1987; Umaer et al., 2014).

El procesamiento de este pre-rRNA es un proceso complejo que involucra la acción de pequeños RNA nucleolares (*snoRNA*) (Chikne et al. 2019), endo- y exonucleasas (Cesaro et al., 2019), la exorribonucleasa XRNE (Sakyama et al., 2013), las helicasas de RNA MTR4 y Hel66 (Cristodero et al., 2007; Bakari-Soale et al., 2021), ATPasas y GTPasas (Jensen et al., 2003), y otras proteínas específicas de tripanosomas como

NOP44/46 (Jensen et al., 2005) y proteínas de unión a RNA como PUF7 (Droll et al., 2010). Además, el exosoma cataliza el procesamiento de un precursor de pre-rRNA 7S para producir el rRNA 5.8S maduro (Estévez et al., 2001).

1.5.2. El RNA ribosómico 5S

El rRNA 5S es un RNA pequeño de 120 nucleótidos con un peso molecular de 40 kDa. Las estructuras secundarias y terciarias generalmente se conservan a lo largo de la filogenia. En *T. brucei* la estructura secundaria del rRNA 5S se compone de cinco hélices y cinco bucles, dos de horquilla, dos internos y uno bisagra que generalmente permite el plegamiento dando lugar a una estructura en forma de Y (Ciganda et al., 2012a). El rRNA 5S se encuentra en la unión entre la subunidad grande y la subunidad pequeña y forma parte de la protuberancia central. Aunque su función exacta dentro del ribosoma no está clara, se cree que desempeña un papel fundamental en las interacciones proteína-RNA y RNA-RNA dentro del ribosoma (Ciganda et al., 2011).

Los genes que codifican el rRNA 5S en *T. brucei* están presentes en cientos de copias agrupadas en unidades de repetición en tándem de 750 pares de bases. Como ocurre en otros eucariotas, el rRNA 5S de *T. brucei* se transcribe de forma independiente por la RNA polimerasa III en el nucleoplasma. Los genes rRNA 5S poseen un promotor de tipo I ubicado aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción, dentro del propio gen. Los promotores de tipo I constan de tres dominios internos: la caja A, un elemento intermedio y la caja C. La transcripción del gen rRNA 5S termina dentro de una región de residuos de timina ubicado aguas abajo de la región codificante. En consecuencia, el extremo 3' del transcrito

INTRODUCCIÓN

contiene varios residuos U que tienen que ser eliminados para generar un rRNA 5S maduro y funcional. (Hitchcock et al., 2004; Moreno-Campos et al., 2016).

Al igual que los anteriores rRNAs, el pre-rRNA 5S necesita ser procesado para dar lugar al rRNA 5S maduro que será posteriormente transportado al nucleolo para incorporarse al precursor de la subunidad grande 60S durante su biogénesis. Hasta la fecha se han identificado algunas proteínas con funciones conservadas y otras exclusivas de tripanosomas que participan en el procesamiento del rRNA 5S y su transporte al nucleolo.

SNIP es una exonucleasa 3'→5' esencial de *T. brucei* involucrada en el paso final de recorte del extremo 3' del rRNA 5S y de otros RNA pequeños. Se localiza en el nucleoplasma y lleva a cabo la eliminación exonucleolítica de los residuos de U. La pérdida de SNIP da lugar a la acumulación de sustratos de rRNA 5S 4-5 nucleótidos más largos que sus formas maduras (Zeiner et al., 2004).

La proteína autoantígeno La de eucariotas es un componente importante de la telomerasa que actúa también como una fosfoproteína que se une a los elementos ricos en poli (U) de los extremos 3' de los transcritos nacientes de la RNA polimerasa III para facilitar su correcto plegamiento y maduración. En *T. brucei* se ha identificado una proteína homóloga a la proteína La que se distribuye principalmente en el núcleo y parcialmente en el citoplasma del parásito. A través de su dominio RRM, se une a la proteína asociada al ribosoma P34/P37 y a la proteína ribosomal L5 (Figura 7). La ausencia de la proteína La conduce a una acumulación en los niveles de pre-rRNA 5S y a una disminución significativa en los niveles de rRNA 5S maduro, lo que implica que la

proteína La juega un papel esencial en el proceso de maduración del rRNA 5S en *T. brucei* (Shan et al., 2019).

Un punto de control crítico durante la biogénesis de los ribosomas es la formación de la ribonucleoproteína 5S (RNP 5S) y su transporte al nucleolo para su incorporación al precursor de la subunidad grande 60S. Al igual que en otros eucariotas, en *T. brucei* este complejo también está formado por el rRNA 5S y la proteína ribosomal L5 (Umaer et al., 2014). L5 es una proteína ribosomal muy conservada que se une al rRNA 5S en el nucleoplasma después de su procesamiento y maduración, lo estabiliza y lo dirige al nucleolo (Figura 7). Sin embargo, en el parásito, L5 también desempeña un papel fundamental en la biogénesis de la subunidad 60S y en el procesamiento de los RNA ribosomales que la componen. La eliminación de L5 conduce a una disminución en los niveles de rRNA 5S, 28S y 5.8S y de las proteínas ribosomales grandes L3 y L11 y una pérdida de subunidades ribosomales 60S, monosomas 80S y polisomas (Umaer et al., 2014).

En *T. brucei* la proteína ribosomal L5 se une al rRNA 5S, pero con menor afinidad que otras proteínas L5 eucariotas. Esto es debido a que, aunque la secuencia de L5 se encuentra conservada, ciertos aminoácidos clave situados en la región C-terminal son sustituidos por otros aminoácidos. Por ejemplo, una arginina en posición 285 en levadura se encuentra sustituida por una alanina en la posición 291 en *T. brucei*. Además, en el parásito solo alrededor del 25% del rRNA 5S se asocia con L5, mientras que en las células de mamíferos la asociación es casi del 90% (Ciganda et al., 2012b). Por tanto, a diferencia de otros eucariotas, L5 no es el único factor de unión al rRNA 5S necesario para su estabilidad y

INTRODUCCIÓN

translocación al nucleolo, sino que *T. brucei* requiere la presencia de otros factores para compensar la unión débil entre rRNA 5S y L5.

Las proteínas específicas de tripanosomátidos p34 y p37 se unen en el nucleoplasma al rRNA 5S y a L5 formando parte de este complejo (Figura 7, Ciganda et al., 2012b). p34 (también llamada NRBD1) y p37 (NRBD2) son dos proteínas de unión a RNA exclusivas de tripanosomátidos. Son muy parecidas entre sí; la única diferencia principal es un inserto de 18 aminoácidos dentro del extremo amino de p37 que está ausente en p34. Se localizan tanto el núcleo como en el citoplasma, contienen dos dominios de unión al RNA (*RNA Binding Domain*, RBD) dentro de la región codificante e interaccionan específicamente con el rRNA 5S en ambas etapas del ciclo de vida del parásito; la proteína p34 se expresa predominantemente en la forma procíclica, mientras que p37 predomina en las formas sanguíneas (Pitula et al., 2002). Estas dos proteínas son esenciales para la biogénesis ribosomal y la supervivencia del parásito (Hellman et al., 2007a), la estabilidad del rRNA 5S y la translocación del rRNA 5S después de su procesamiento y maduración (Ciganda et al. 2012). La pérdida de estas dos proteínas conduce además a una disminución en la formación de ribosomas maduros 80S y a una disminución general en la síntesis de proteínas (Hellman et al. 2007a).

El estudio más detallado del papel de estas proteínas en la biogénesis ribosomal ha puesto de manifiesto que p34 y p37 se asocian con los factores de exportación nuclear de la subunidad ribosomal 60S exportina 1 y Nmd3 (Figura 7). Además, p34 y p37 permanecen asociadas con ribosomas 80S maduros, por lo que podrían desempeñar un papel en la unión de subunidades o el inicio de la traducción (Prohaska et al., 2009).

Una vez el complejo RNP 5S se localiza en el nucleolo, la proteína ribosomal L11 (Jaremko et al., 2019b) y los factores de ensamblaje Rrs1 (Jaremko et al., 2019a) y Rpf2 (Kamina et al., 2017) se unen al complejo para llevar a cabo el ensamblaje de la RNP 5S en la subunidad preribosomal 90S (Figura 7).

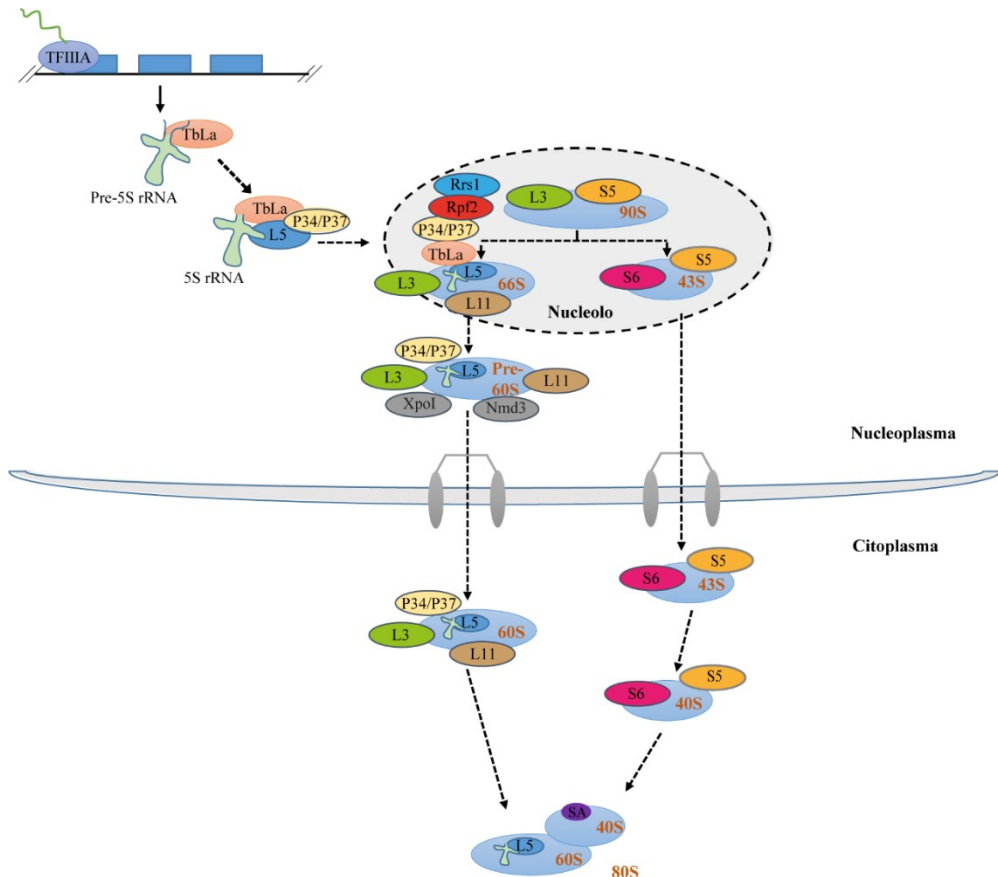


Figura 7. Biogénesis ribosomal y exportación de subunidades. Modificado de (Shan et al., 2019).

1.5.3. Exportación de subunidades y ensamblaje del ribosoma

Al igual que en otros eucariotas, en *T. brucei* la biogénesis de los ribosomas comienza dentro del nucleolo con el ensamblaje de proteínas

INTRODUCCIÓN

ribosomales, factores accesorios y las cuatro especies de rRNA. El proceso continúa en el nucleoplasma, donde la adición y eliminación de factores accesorios da como resultado cambios conformacionales específicos de las subunidades del ribosoma. Por último, las subunidades pre-60S y pre-40S se translocan al citoplasma donde se completa la maduración y se unen para formar el ribosoma 80S maduro.

La translocación de subunidades ribosomales individuales 60S y 40S desde el núcleo al citoplasma se lleva a cabo a través del poro nuclear por el complejo de exportación nuclear, Exportina 1 (Xpo1) y la proteína adaptadora Nmd3. *T. brucei* utiliza un complejo de exportación nuclear similar al descrito para levaduras y mamíferos. Las subunidades 60S de *T. brucei* se asocian con Exportina 1 y con un homólogo de Nmd3. Las proteínas específicas de tripanosoma p34/p37 son esenciales para la interacción del complejo de exportación TbNmd3-TbXpoI con las subunidades ribosomales 60S, lo que permite su translocación a través de la envoltura nuclear (Prohaska et al., 2009).

La exportación nuclear de subunidades ribosomales 60S y 40S depende en parte de la actividad de los receptores de exportación auxiliares TbMtr2 y TbMex67. La caracterización del papel funcional de los receptores TbMex67 y TbMtr2 en la biogénesis de ribosomas ha revelado que interactúan con L5, P34/P37 y el rRNA 5S (Rink and Williams, 2019) y su pérdida conduce a la formación de ribosomas aberrantes y provoca una disminución general de la traducción (Rink et al., 2019).

1.6. Traducción

El inicio de la traducción comienza con el ensamblaje del complejo eIF4F al *cap4* del extremo 5' del mRNA. El complejo eIF4F está formado por la asociación de las subunidades eIF4E, eIF4G y eIF4A, donde eIF4E reconoce y se une a la 7-metilguanosina del *cap4*, eIF4G actúa como andamio e interacciona con varias proteínas asociadas, y eIF4A actúa como RNA helicasa responsable de desenrollar cualquier estructura secundaria que se encuentre en el mRNA.

La unión de eIF4F al *cap4* facilita el reclutamiento de la subunidad ribosomal pequeña y otros factores de inicio de la traducción, como eIF2 y eIF3, al mRNA. A continuación, la subunidad pequeña escanea la región 5' no traducida (5'-UTR) del mRNA hasta encontrar el codón de inicio AUG, momento en el cual se produce el reclutamiento de la subunidad ribosomal grande y la liberación de los factores de iniciación.

Simultáneamente, la proteína de unión poli-A (PABP, *poly-A binding protein*) que se encuentra unida a la cola poli-A del extremo 3' del mRNA y, a través de su interacción con eIF4G, promueve la circularización del mRNA, lo que lleva a una formación de bucle cerrado, aumentando así la eficiencia y frecuencia del inicio de la traducción (Kramer et al., 2013; Bezerra et al., 2022).

Hasta la fecha, se han identificado múltiples homólogos para las subunidades de eIF4F en tripanosomátidos. Existen seis homólogos eIF4E, cinco eIF4G y dos eIF4A. Los seis homólogos de eIF4E se encuentran conservados en especies de *Leishmania* y *Trypanosoma*, y pueden emparejarse en tres grupos distintos, basándose en sus propiedades estructurales y moleculares y en las proteínas con las que se asocia. El

INTRODUCCIÓN

primer grupo lo componen eIF4E1 y eIF4E2 que se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma con un tamaño similar y alta similitud a su correspondiente homólogo eIF4E humano. No parecen estar directamente involucrados en la traducción, pero realizan funciones esenciales para la viabilidad celular. El segundo grupo está formado por los homólogos eIF4E3 y eIF4E4 estrictamente citoplasmáticos, presentes en mayor abundancia que sus correspondientes homólogos en otros eucariotas y con largas extensiones N-terminales y menor similitud global. Sin embargo, eIF4E3 y eIF4E4 tienen la capacidad de interactuar con homólogos de eIF4G formando dos complejos eIF4F, eIF4E4 - eIF4G3 y eIF4E3 - eIF4G4, claramente implicados en el inicio de la traducción (Freire et al., 2011). En el tercer grupo se incluyen eIF4E5 y eIF4E6, proteínas muy pequeñas con escasa homología, pero capaces de unirse a homólogos de eIF4G formando complejos eIF4F que probablemente no participen en la traducción general (Freire et al., 2017).

Los cinco homólogos de eIF4G comparten un dominio central conservado en todas las especies de tripanosomátidos. eIF4G3 y eIF4G4 tienen además características de secuencia conservadas fuera del dominio central que no están conservadas en eIF4G1, eIF4G2 y eIF4G5. Hasta la fecha, se ha demostrado que eIF4G3 y eIF4G4 forman complejos similares a eIF4F, a través de interacciones con eIF4AI y dos eIF4E3 y eIF4E4, en *T. brucei* y en *Leishmania* (Freire et al., 2011). Tanto eIF4G3 como eIF4G4 son esenciales para la viabilidad de la forma procíclica de *T. brucei*, pero solo el agotamiento de eIF4G3 afecta directamente a la síntesis de proteínas (Moura et al., 2015). Más recientemente, se ha demostrado que eIF4G1, eIF4G2 y eIF4G5 forman complejos con dos nuevos homólogos de eIF4E, eIF4E5 y eIF4E6, pero no se han relacionado con el proceso de iniciación de la traducción.

Además, *T. brucei* tiene dos homólogos para las proteínas de unión poli(A), PABP1 y PABP2. Ambas proteínas se localizan en el citoplasma; sin embargo, exhiben diferencias importantes en la localización y distribución intracelular en respuesta a diversas condiciones que interfieren con el metabolismo del mRNA, como la inhibición de la traducción o el *trans-splicing*. Estas observaciones indican que PABP1 y PABP2 probablemente se asocian con distintas poblaciones de mRNAs (Kramer et al., 2013). Además, PABP1 coprecipita específicamente con eIF4E4 - eIF4G3, mientras que PABP2 coprecipita con diferentes subunidades eIF4E/eIF4G, interactúa con una gama más amplia de proteínas e ingresa en gránulos de estrés (Zoltner et al., 2018; Bezerra et al., 2022).

1.7. La proteína de unión a RNA ZC3H41

Tb927.11.1980, conocida como ZC3H41, es una proteína con un dominio de dedo de zinc esencial en la forma procíclica de *T. brucei* (Eliaz et al., 2017), que se ha descrito como un componente de los gránulos que se forman cuando el parásito es sometido a estrés nutricional (Fritz et al., 2015). Por otra parte, ZC3H41 se encuentra asociada débilmente al SL RNA y parece acumularse en vesículas cuando el *trans-splicing* del SL RNA es inhibido por estrés. Estas vesículas son liberadas al medio extracelular y pueden controlar la migración del parásito en el insecto huésped al actuar como repelente que aleja a parásitos vecinos de células dañadas o de un entorno desfavorable, asegurando así una infección productiva (Eliaz et al., 2017).

En estudios previos en nuestro laboratorio, detectamos a ZC3H41 unido de forma no específica a un elemento regulador de RNA sensible a purinas, probablemente como consecuencia de la interacción con la

INTRODUCCIÓN

secuencia del SL RNA utilizada para la cromatografía del RNA (Rico-Jiménez et al., 2021).

Sin embargo, aunque la función de esta proteína esencial sigue sin estar clara, hasta la fecha, los resultados sugieren una conexión entre ZC3H41 y el metabolismo del RNA. El estudio y la mejor comprensión del papel de ZC3H41 se describe en la presente tesis doctoral.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido la caracterización funcional *in vivo* de la proteína de unión a RNA ZC3H41 en formas procíclicas de *T. brucei*.

Con este fin, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el impacto de ZC3H41 sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular.
2. Identificar proteínas asociadas a ZC3H41.
3. Estudiar los cambios globales que ocurren en el transcriptoma tras silenciar la expresión de ZC3H41.
4. Caracterizar el subconjunto de mRNAs a los que se une ZC3H41.
5. Evaluar la dinámica del complejo ribonucleoproteico de ZC3H41 en respuesta a estrés nutricional.
6. Analizar posibles efectos en la biogénesis del ribosoma y la traducción.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Líneas celulares de *Trypanosoma brucei*

Los experimentos de esta tesis doctoral han sido realizados con la línea parental de la forma procíclica 449 (Biebinger et al., 1997) de *T. b. brucei*, caracterizada por la integración en su genoma de un gen represor inducible por tetraciclina (*TetR*). Esto permite la expresión inducible de genes mediante la adición de tetraciclina en el medio de cultivo. Las líneas celulares generadas derivadas de la línea parental se indican primero con el nombre de la línea parental seguida del número correspondiente al plásmido transfectado.

3.1.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis han sido sintetizados por Sigma Aldrich y Metabion international AG (Condolab).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Propósito
AE772	CAAAGCTTCAATGAGCAGCGCGGTAGATTC	Clonación de la secuencia de ZC3H41 (Tb927.11.1980) para la expresión de un epítipo TAP
AE773	GAGACACCGTTGAAATAGCGAGTG	
AE774	GAGGATCCAAGCTTTCAAAGACGGTAAACC	RNAi de ZC3H41
AE775	GTGGGGCCACGCATTAAGTTAGAGGAGG	
AE786	TCAAGCTTTGGTTTTTCCACACACGGCA	Clonación de la secuencia de ZF41AP (Tb927.7.7460) para la expresión de un epítipo TAP
AE787	GTATCTTCCTCATGCGAAGTTTGC	
AE789	AAGGATCCAAGCTTGCCAGTGGACACTTA	RNAi de ZF41AP
AE790	CATGGGCCCTTTCCTTGTTCAATTACCTC	
AE1075	CGGGATCCAAGCTTGTATTGGTGTGACACGTG	RNAi alternativo de ZC3H41 (Tb927.11.1980)
AE1076	CACGGGGCCCGAGACACCGTTGAAATAGCG	
AE776	CAACAGCGAACACAGTAAGCTGG	qPCR de <i>ZC3H41</i>

MATERIALES Y MÉTODOS

AE773	GAGACACCGTTGAAATAGCGAGTG	(Tb927.11.1980)
AE1094	GCAAATTGATAACGCAACGCACG	qPCR de <i>Trans-sialidasa</i> (Tb927.11.11410)
AE1095	CCGTCATTCTAACATGTGACC	
AE184	CAAACAGCCCTTATTCAACACCTCAGC	qPCR de <i>AATP11</i> (Tb927.4.4730)
AE215	GCAGCTCAGTGTCTCTATAAATCAATGC	
AE809	AACTATTTGGACTGCCTCAGTACG	qPCR de <i>NT8</i> (Tb927.11.3610)
AE810	GGAAGTAAATGCCGGACACACC	
AE1082	AGAAGAACCGTGAGGCTCGC	qPCR de <i>L4</i> (Tb927.3.5050)
AE1083	GCTTACTTCTCTTGAGTGCTTTCG	
AE1084	CGCAGCGAAAGCAAAGGTTGC	qPCR de <i>L5</i> (Tb927.9.15110/Tb927.9.15170)
AE1085	CTCACTACAGAGCGTGTCTTCC	
AE1088	GAGCAAATGAGGATCGAGGAAGC	qPCR de <i>L38</i> (Tb927.9.2020)
AE1089	AAGAGACGTTAGCACAGTTGACC	
AE1090	AAGTAAGTTGTACGACTCCGTGC	qPCR de <i>L38</i> (Tb927.10.3280)
AE1091	CAACTATTGGTTGAGAAGCGTGC	
AE885	CAAATCGATTATCCAGAACGTGC	qPCR de <i>L44</i> (Tb927.11.3230)
AE886	CAAACCGGATGTCATCAGTCTCG	
AE1192	GTACAGGCATCCATGCAGTCG	qPCR de <i>BTF3</i> (Tb927.11.9700)
AE1193	TTCACATAGCACCCCTATGAAGG	
AE1190	CGTACCGTCAGAACTATGCTTACG	qPCR de <i>NRBD1/2</i> (Tb927.11.14000/Tb927.11.14020)
AE1191	GAAGCGAGCGAGTTGAAAGAGC	
AE1092	CATCTGGCAACCGCCTCAAACG	qPCR de <i>RRS1</i> (Tb927.6.2050)
AE1093	GGTAAATAACACGTATATAAACCAGCTG	
AE1202	GTTACGATGTAGCAGTGGAGG	qPCR de <i>RPC4</i> (Tb927.9.10680)
AE1203	GCCATATCCGTAGGCTGTTGG	
AE1204	GTGCAGATACAGATGCGCTCC	qPCR de <i>RPC11</i> (Tb927.10.15150)
AE1205	CTAATCCTGCTTCCACTGGAAGC	
AE1086	GAAGTGCAGCAAGAAGCGTGC	qPCR de <i>L7a</i>

AE1087	CAACGTAGTAAATGCCAGAATACAGG	(Tb927.8.1330/Tb927.8.1340)
AE861	CACTTCAAGACCGACATCAAGG	qPCR de <i>L37</i> (Tb927.9.9210)
AE862	GATAAATAAACGTCGCATCAGAAAG	
AE1110	GCAAGACAAAGGCGAAGTCCACC	qPCR de <i>L14</i> (Tb927.6.720)
AE1111	GACTCATCGGGAACGTCGAGG	
AE893	CGGTAAGTCCAAGACTAAGGTGG	qPCR de <i>L14</i> (Tb927.11.11230)
AE894	GATGGGCGGATAACCACATTGC	
AE422	CCACCTTCATGAGGGATGTTGCTGTCC	qPCR de <i>L36</i> (Tb927.10.1590)
AE423	CCAACGTCCGCCACCTCTATCAGC	
AE889	ATTGGCTGATCAGTTGCGTGAGG	qPCR de <i>S8</i> (Tb927.8.6150/Tb927.8.6160)
AE890	ATGGTTTCATAACGCCTCCTAACG	
AE1198	GGTAATCTTCGACTTGAGCTGC	qPCR de <i>eIF1A</i> (Tb927.8.5880)
AE1199	GTTGAACTCCCGCTTCGAAACC	
AE604	GATTCGTGCCAACGGCACTCG	qPCR de rRNA <i>LSUa</i> (Tb927.3.3423)
AE605	CCTTTTCAGATAAGCCGGTAAAACAC	
AE606	CCAAGTGCAGACCGTACTCATC	qPCR de rRNA <i>LSUb</i> (Tb927.3.3425)
AE607	CACGTCCGAGCAAAAACGGTCG	
AE602	GTTGATTCTGCCAGTAGTCATATGC	qPCR de rRNA <i>SSU</i> (Tb927.3.3421)
AE569	GTAATGAGCCATGCGCAGATTCC	
AE572	GGCTTCCTATTTGTTGAAGAACG	qPCR de rRNA 5.8S (Tb927.3.3422)
AE603	CGACTGAGAAATGTGGCATGC	
AE1177	CGACCATACTTGCCGAATGC	qPCR de rRNA maduro 5S (Tb927.8.1381)
AE1178	TTCCAGCGCCATCACTGATCG	
AE1206	GCATTCCGGTTTACCGGACGTC	qPCR de pre- rRNA 5S (Tb927.8.1381)
AE1179	TGCAGCTTAGGAAAAAAGTTTGG	
AE1109	GCTCACACGTGCCGTTTCATTGC	

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en esa tesis

3.1.3. Plásmidos

Plásmido	Propósito	Inserto	Plásmido parental	Antibiótico de selección
pGR307	N-TAP	Fragmento correspondiente a 1-1100 pb del ORF de ZC3H41	p2676 (Kelly et al., 2007)	PURO
pGR315	N-TAP	Fragmento correspondiente a 1-451 pb del ORF ZF41AP	p2676 (Kelly et al., 2007)	PURO
pGR309	RNAi	Últimas 398 bp del ORF más 101 pb de la 3'-UTR de ZC3H41	pGR19 (Clayton et al., 2005)	HYG
pGR318	RNAi	Últimas 381 bp del ORF más 16 pb de la 3'-UTR de ZF41AP	pGR19 (Clayton et al., 2005)	HYG
pGR440	RNAi	Fragmento correspondiente a 736-1101 pb del ORF de ZC3H41	pGR19 (Clayton et al., 2005)	HYG
PGR314	N-4xTy	ORF ZC3H41	p3077/bla (Rico-Jiménez et al., 2021)	BLA
PGR351 (Rico-Jiménez et al., 2021)	TAP-C	Fragmento correspondiente a 2304-2887 pb del ORF de PuREBP1	pGR344 (Rico-Jiménez et al., 2021)	G418
pGR335 (Rico-Jiménez et al., 2021)	RNAi	ORF de PuREBP1	pGR19 (Clayton et al., 2005)	HYG

Tabla 2. Plásmidos utilizados en esta tesis

3.1.4. Antibióticos

Antibiótico	Abreviatura	Stock	Concentración final	<i>E. coli</i>
Fleomicina	FLEO	20 mg/ml	1 µg/ml	-
Higromicina	HYG	50 mg/ml	50 µg/ml	-
Blasticidina	BLA	10 mg/ml	20 µg/ml	-
Geneticina	G418	15 mg/ml	15 µg/ml	-
Puromicina	PURO	1 mg/ml	1 µg/ml	-
Tetraciclina	TET	1 mg/ml	1 µg/ml	-
Ampicilina	AMP	100 mg/ml	-	100 µg/ml

Tabla 3. Antibióticos utilizados en esta tesis

3.1.5. Anticuerpos

Anticuerpos primarios				
Nombre	Especie	Origen	Inmunotransferencia	Inmunofluorescencia
PAP		Sigma	1:10.000	
Anti-Protein A	Conejo	Sigma	1:10.000	1:50.000
Anticuerpo monoclonal BB2	Ratón	Bastin, 1996	1:200	
Anti- α -tubulina	Ratón	Sigma, clon B-5-1-2	1:20.000	
Anti-p34/p37 (NRBD1/2)	Conejo	Zhang et al., 1997	1:1000	
anti-P0	Conejo	Skeiky et al., 1994	1:10.000	
anti-S9	Rata	Cedido por Christine Clayton	1:1000	
anti-DRBD3	Conejo	Estévez, 2008	1:10.000	
anti-RRP4	Conejo	Estévez et al., 2001	1:100	
Anti-EP1	Ratón	Cedarlane		1:1000
Anti-puromicina	Ratón	Merckmillipore, clon 12D10	1:5000	

Anticuerpos secundarios				
Anti-IgG de conejo HRP	Cabra	Promega	1:5000	
Anti-IgG de ratón HRP	Cabra	Promega	1:5000	
Anti-IgG de conejo H&L LI-COR IRDye 800CW	Cabra	Biosciences	1:5000	
Anti-IgG de ratón H&L LI-COR IRDye 680RD	Cabra	Biosciences	1:5000	
Anti-IgG de ratón Alexa Flúor 488	Cabra	Invitrogen		1:2000

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en esta tesis

3.1.6. Medios y tampones

SDM-79	MEM (GIBCO) 0.7% (p/v); medio 199 (GIBCO) 0.2 (p/v), aminoácidos esenciales MEM 50X (Sigma) 0.8% (p/v); aminoácidos no esenciales MEM 100X (Sigma) 0.6% (p/v); 5.6 mM glucosa, 30 mM Hepes, 24 Mm MOPS, 24 mM NaHCO ₃ , 1mM piruvato sódico, 2.24 mM D-L-alanina, 574 µM L-arginina, 2 mM L-glutamina, 469 µM D-L-metionina, 484 µM L-fenilalanina, 5.2 mM L-prolina, 571 µM D-L-serina, 1.28 mM taurina, 2.94 mM D-L-treonina, 552 µM tirosina, 35 µM guanosina, 9 µM ácido fólico, 232 µM D(+) glucosamina, 14,6 µM ácido p-aminobenzoico, 800 µM biotina. Filtrar y añadir BSF al 10% y 11.5 µM hemina
--------	--

Agar LB	1% triptona, 0.5% levadura, 1% NaCl y 1.5% agar
Citomix	2 mM EGTA, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, 10 mM fosfato potásico pH 7.6, 25 mM Hepes, 5 mM MgCl ₂ .6 H ₂ O, 0.5% glucosa, 100 µg/ml BSA y 1 mM hipoxantina
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ y 1.8 mM de KH ₂ PO ₄ pH7.4; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl
PBST	PBS + 0.1% Tween 20
vPBS	PBS + 10 mM glucosa y 46 mM sacarosa
Laemmli 5X	0.625 M Tris-HCl pH 6.8, 10% (p/v) SDS, 40% (p/v) glicerol, 7.5% (v/v) β-mercaptoetanol, 1.5% azul de bromofenol
Tampón de electroforesis SDS-PAGE 10X	0.25 mM Tris, 1.92 glicina y 1% SDS
Tampón de transferencia 10X	0.25 mM Tris, 1.92 glicina y 20% metanol
Solución de revelado	10 ml de solución A (250 mg/l luminol + 100mM de Tris-HCl pH 8.5), 100 µl de solución B (180 mg 4-yodofenol + 20 ml de DMSO), 4µl de 30% H ₂ O ₂ .
Tampón de lisis (TAP)	10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM DTT, 0.1 % Igepal, inhibidor de proteasas 1X (Roche).
Tampón de elución (TAP)	10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM CaCl ₂ y 20 mM EGTA
IPP-150	10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Igepal CA-630.
Tampón TEV	10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal CA-630, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT (añadido en el momento).
MOPS 10X	0.2 M de MOPS, 80 mM de NaAc, 10 mM de EDTA pH 7.0 (NaOH). Guardar en oscuridad a 4°C.
Tampón de carga para electroforesis de RNA	1X MOPS, 50% formamida, 6.5% de formaldehido, 0.2 µg/ml de bromuro de etidio.

Tabla 5. Medios y tampones utilizados en esta tesis

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.7. Programas informáticos y bases de datos

3.1.7.1. Programas informáticos

Gene construction kit version 4.0

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

FlowJo versión 10.0

FIJI/ImageJ

Adobe Photoshop CS5.1 versión 12.1

Adobe Illustrator CS5.1 versión 15.1.0

3.1.7.2. Bases de datos

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>)

TrypTag (<http://tryptag.org/>)

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo de *Trypanosoma brucei*

La forma procíclica de *T. brucei* se cultivó en medio SDM-79 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBF) y 2,5 mg/ml de hemina en un incubador a 28°C. Los cultivos se mantuvieron en fase logarítmica con diluciones periódicas cada dos días. Para los experimentos en condiciones de estrés nutricional, las células se recogieron en fase de crecimiento logarítmico, se lavaron dos veces en

solución salina tamponada con fosfato (PBS), se resuspendieron en el volumen original de PBS y se incubaron a 28°C durante 3 horas con agitación suave.

La densidad celular se determinó con un contador de partículas Z2 Coulter Counter (Beckman).

3.2.2. Congelación y descongelación de células

Para su congelación, las células se recogieron en fase exponencial mediante centrifugación a 1000g durante 10 minutos a 4°C. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo con 10% (v/v) de glicerol. Las células se congelaron en criotubos lentamente hasta los -80°C. Para su conservación durante largos periodos los viales se transfirieron a nitrógeno líquido.

La descongelación se llevó a cabo rápidamente introduciendo el criotubo en un baño a 37°C, traspasando a continuación el contenido a un tubo con medio de cultivo fresco que se centrifugó 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar el glicerol. Finalmente, las células se transfirieron a un frasco con medio de cultivo.

3.2.3. Clonación de vectores

Los protocolos de corte de DNA con enzimas de restricción, ligación y desfosforilación de fragmentos de DNA utilizados en esta tesis se encuentran descritos en (Sambrook et al., 1989) o descritos por los fabricantes de las enzimas utilizadas.

3.2.4. Aislamiento de DNA genómico

Para el aislamiento de DNA genómico de *T. brucei* se recogieron 10-20 x 10⁶ células mediante centrifugación a 1400g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el precipitado se resuspendió en 200 µl de DNAzol (Molecular Research Center). A continuación, se añadieron 100 µl de etanol absoluto, se dejó 5 minutos a -20°C y se centrifugó 20 minutos a 4°C a 16.000g. Posteriormente tras lavar dos veces con 70% etanol, se dejó secar el precipitado y finalmente se resuspendió en 100 µl de agua Milli-Q durante toda la noche a 4°C.

3.2.5. Preparación de células competentes de *E. coli*

Para la clonación de los plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* DH5α preparadas siguiendo el protocolo descrito por (Inoue et al., 1990).

3.2.6. Transformación de *E. coli*

Para su transformación con plásmidos de DNA, las células de *E. coli* se pusieron en hielo y se añadieron 5 µl de la mezcla de la ligación. Se incubaron durante 20-30 minutos y se llevó a cabo la transformación por choque térmico introduciéndolas en un baño de agua a 42°C durante 30 segundos y posteriormente devolviéndolas al hielo durante 2 minutos. Las células se plaquearon directamente en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

3.2.7. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Se utilizó el kit de purificación de DNA NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

3.2.8. Amplificación de DNA

El DNA se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando la polimerasa Phusion™ High-Fidelity (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los oligonucleótidos (Tabla 1) se diseñaron utilizando el programa Gene Construction Kit 4.0 y OligoCalc. Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

3.2.9. Precipitación de ácidos nucleicos

La precipitación de DNA se llevó a cabo añadiendo 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, mientras que para la precipitación de RNA se usaron 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto en presencia de 20 µg de glucógeno.

En ambos casos, la mezcla se incubó a -20°C durante al menos 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 16.000g durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y finalmente de resuspendió en 10 µl u 11.5 µl de agua Milli-Q (en el caso de DNA o RNA, respectivamente).

3.2.10. Transfección estable de tripanosomas procíclicos

Se recogieron un total de 20×10^6 tripomastigotes procíclicos por transfección en fase exponencial a 1000g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 µL de citomix frío. Los 100 µL de la suspensión se transfirieron a una cubeta BTX estéril junto con 10 µg de DNA plasmídico linearizado. La transfección se llevó a cabo

en un Nucleofector Amaxa utilizando el programa X-14 (Burkard et al., 2007). Tras la transfección, las células se transfirieron a 10 ml de SDM-79 suplementado con 20% de SBF. Tras 24 horas se procedió a la selección con el antibiótico correspondiente. Se realizaron dos diluciones 1:10 y 1:100 del cultivo y se repartieron en placas de 96 pocillos. Los transfectantes fueron visibles a partir del décimo día.

3.2.11. Expresión de proteínas etiquetadas en *T. brucei*

Para la expresión de proteínas fusionadas a la etiqueta TAP en el extremo amino-terminal, se clonaron fragmentos del marco de lectura abierto (ORF) de ZC3H41 (Tb927.11.1980) o Z41AP (Tb927.7.7460) en el vector p2676 (Kelly et al., 2007) para producir los nuevos vectores pGR307 y pGR315, respectivamente. Además, se generó un plásmido de expresión alternativo para expresar ZC3H41 fusionada a la etiqueta 4xTy en el extremo N-terminal usando el vector p3077bla para producir el vector pGR314. Los oligonucleótidos utilizados para la clonación se describen en la Tabla 1. Los plásmidos se transfectaron en células procíclicas 449 y se seleccionaron en presencia de 1 µg/ml de puromicina en el caso de pGR307 y pGR315 o 20 µg/ml de blasticidina para pGR314. La detección de proteínas etiquetadas con TAP se llevó a cabo mediante inmunotransferencia con un reactivo PAP (Sigma) o un anticuerpo anti-proteína A (Sigma), mientras que los niveles de proteína etiquetada con 4xTy se determinaron con un antisuero monoclonal BB2 (Bastin et al., 1996).

3.2.12. Ribointerferencia (RNAi)

Para los estudios de RNAi el fragmento del gen *ZC3H41* (Tb927.11.1980) correspondiente a los últimos 398 pb del ORF más 101

pb de la región 3'-UTR, se amplificó por PCR y se clonó en el vector pGR19 en orientaciones opuestas y separados por una región de DNA llamada *stuffer*, generando una estructura de tallo-lazo (Clayton et al., 2005), dando lugar al plásmido pGR309. Siguiendo la misma estrategia, se amplificó el fragmento del gen *Z41AP* (Tb927.7.7460) correspondiente a los últimos 381 pb del ORF más 16 pb de la región 3'-UTR y se clonó en el vector pGR19, originando el plásmido pGR318. Además, se generó un plásmido de RNAi alternativo para ZC3H41 usando un fragmento correspondiente a las posiciones 736 a 1101 del ORF para producir pGR440.

Los oligonucleótidos utilizados para la clonación se describen en la Tabla 1. Se transfectaron tripanosomas que expresaban TAP-ZC3H41 o TAP-Z41AP con pGR309, pGR318 o pGR440 linealizados con la enzima de restricción NotI y se seleccionaron en presencia de 50 µg/ml de higromicina. Para la inducción de RNAi, se añadió tetraciclina al medio de cultivo a una concentración de 1 µg/ml. Se comparó el crecimiento a las 48 horas y se seleccionaron aquellos clones en los que el crecimiento se vio reducido comparado con el cultivo no inducido.

3.2.13. Preparación de lisados de proteínas

Para la obtención de extractos de células totales, los tripanosomas procíclicos se recogieron en fase exponencial de crecimiento y se centrifugaron a 1400g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con PBS 1X, se resuspendió en tampón Laemmli 1X y se calentó a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida a una concentración de 1×10^6 parásitos/pocillo. Para determinar la masa molecular se usó como marcador Benchmak™ (Invitrogen).

3.2.14. Inmunotransferencia

Las muestras se cargaron en geles de electroforesis de 1 mm de grosor al 10% SDS-PAGE (Sambrook et al., 2006) y se separaron por tamaños en un sistema de electroforesis Protean (Bio-Rad) a 200V durante 50 minutos. Las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) mediante un sistema de transferencia de inmersión Mini-Protean (Bio-Rad) en frío, a 100V durante 45 minutos en tampón de transferencia. La membrana se bloqueó durante 30 minutos con PBS 1X suplementado con 0.05% (p/v) de Tween 20 y 5% (p/v) de leche en polvo (Sveltesse). Se incubó 1 hora 30 minutos con anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBST-leche. Tras tres lavados de 5 minutos con PBST, se incubó la membrana durante una hora con el anticuerpo secundario diluido en PBST-leche. Tras otros tres lavados de 5 minutos, se procedió a la visualización de las proteínas mediante quimioluminiscencia con una solución de revelado preparada en el laboratorio, o un sistema de detección de señal fluorescente de infrarrojo cercano LI-COR Odyssey® CLx (Biosciences).

3.2.15. Inmunofluorescencia

Para determinar la localización intracelular y el efecto de la inhibición de las proteínas TbZC3H41 y TbZ41AP sobre el ciclo celular, se recogieron 1×10^7 tripanosomas procíclicos no inducidos e inducidos por RNAi mediante centrifugación a 1000g 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se adhirieron en un portaobjetos previamente tratado con poli-L-lisina a 0.1 mg/ml durante 10 minutos y secado durante toda la noche. Las células se fijaron con 4% (p/v) de paraformaldehído en PBS 1X durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con 0.2% (p/v) de

Tritón X-100 en PBS durante 20 minutos. Tras dos lavados con PBS 1X, las muestras se bloquearon utilizando 20% de suero bovino fetal en 0.1% PBS-Tween 20 durante 30 minutos. Después de lavar, las células se incubaron 1 hora con el anticuerpo primario anti-EP1 o anti-proteína A diluido en solución de bloqueo. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS-T y uno con solución de bloqueo antes de incubar una hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa Flúor 488, diluido en solución de bloqueo. Tras tres lavados, se procedió a fijar la preparación con metanol y se dejaron secar las muestras. Se añadió una gota de medio de montaje DAPI (Vectashield) y se cubrió con un portaobjetos. La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A1 y se analizaron mediante el software Fiji/ImageJ.

Para el análisis del número y morfología de los núcleos y kinetoplastos, se contaron al menos 500 células para cada punto de tiempo.

3.2.16. Citometría de flujo

Se recogieron 2.5×10^7 tripomastigotes procíclicos no inducidos o inducidos por RNAi mediante centrifugación a 1400g durante 10 minutos a 4 °C y se lavaron una vez con 5 ml de PBS 1X frío. Los parásitos se fijaron a -20°C durante la noche en una solución de etanol al 70% y 30% de PBS 1X. Al día siguiente, los parásitos se centrifugaron a 1400g durante 10 minutos a 4°C y se lavaron con PBS 1X frío. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 500 µl de PBS 1X que contenía 40 µg/ml de yoduro de propidio (PI, Sigma) y 10 µg/ml de RNasa A (Thermo Scientific), y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El contenido de DNA de las células teñidas con PI se midió con un citómetro de flujo FACSCalibur o FACSymphony (Becton Dickinson)

usando el detector FL3. Para cada punto de tiempo, se midieron 20.000 eventos por muestra. La población se estableció manualmente a partir del cultivo no inducido y se aplicaron los mismos ajustes a todas las muestras. Para el análisis de los porcentajes de células en fase subG1, G1/S y G2/M, así como aquellas con más de dos núcleos ($>2N$), se empleó el software FlowJo.

3.2.17. Purificación por afinidad en tándem (TAP) y espectrometría de masas

Se utilizaron las líneas celulares procíclicas que expresaban TAP-ZC3H41 y TAP-Z41AP desde el locus endógeno. Los complejos de proteínas se purificaron utilizando el método TAP (Puig et al., 2001) con las modificaciones descritas en (Fernández-Moya et al., 2012). Se recogieron 1×10^{10} células en fase logarítmica de crecimiento y se lavaron con PBS frío. En hielo, el precipitado se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis y la suspensión se pasó 3 veces por una aguja 27G. El lisado se centrifugó a 16.000g durante 10 minutos a 4°C. Para las muestras que se trataron con RNasa, la mitad del lisado se incubó con 50 µg de RNasa A y 1.000 unidades de RNasa T1 durante 30 minutos en hielo antes de la centrifugación. Se recogió el sobrenadante y se añadió NaCl a una concentración final de 150 mM. El procedimiento de purificación por TAP se llevó a cabo tal y como se describe en (Puig et al., 2001) con las siguientes modificaciones: la digestión con la cisteín-proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) se realizó durante toda la noche a 4°C y la unión a la resina de calmodulina durante 4 horas a 4°C. Los complejos de proteínas se eluyeron en 1 ml de tampón de elución y se precipitaron durante 30 minutos en hielo con 20% de ácido tricloroacético (TCA) y 0.08% de desoxicolato de sodio en tubos siliconizados. El precipitado se lavó con

acetona y se dejó secar. Las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10% que se tiñó con Sypro Ruby (Lonza, Rockland, USA).

Para teñir los geles con Sypro Ruby, se añadió directamente la solución comercial y se dejó tiñendo durante toda la noche. El exceso de tinción se eliminó lavando tres veces con una mezcla de 10% de metanol y 7% de ácido acético.

Las bandas seleccionadas se cortaron y se enviaron al servicio de Proteómica del IPBLN para su análisis por MALDI TOF/TOF en un espectrómetro de masas UltrafleXtreme (Bruker). La identificación de proteínas se asignó mediante huellas peptídicas y se confirmó mediante análisis MS/MS de al menos dos péptidos en cada muestra. Se utilizó la herramienta de búsqueda Mascot 2.0 (Matrix Science) para la identificación de proteínas.

3.2.18. Ensayos de UV-*crosslinking* y polinucleótido quinasa (T4 PNK)

Se siguió el método descrito en (Beckmann et al., 2015) con algunas modificaciones. Se lavaron 2×10^9 tripomastigotes procíclicos que expresaban TAP-ZC3H41 o TAP-Z41AP en medio SDM-79 sin suero y se resuspendieron en 2 ml de solución salina tamponada con fosfato modificada con hielo de Voorheis (vPBS). La mitad de las células se irradiaron con luz UV dos veces en hielo a 400 mJ/cm^2 en un aparato Stratalinker (Stratagene) en un único pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos. Las suspensiones celulares se centrifugaron, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los precipitados se resuspendieron en $500 \mu\text{l}$ de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, DTT 2 mM, MgCl_2 5 mM, Igepal CA630 al 0.5 % e inhibidores de

proteasas (mini cóctel completo sin EDTA, Roche) y se lisaron mediante un breve vórtex. Los extractos celulares se centrifugaron a 16.000g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se trataron con 100 µg de RNase A (Sigma) y 10 unidades de DNase I (Promega) durante 30 minutos en hielo. Se añadió NaCl a una concentración final de 150 mM y la mezcla se incubó durante 2 horas a 4°C en presencia de 1 mg de bolitas epoxy paramagnéticas (M-270, Invitrogen) conjugadas a IgGs de conejo (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Las bolitas se lavaron cuatro veces con Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, Igepal al 0,5 % y dos veces con tampón T4 PNK (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól -DTT- 5 mM, Igepal CA630 al 0,1 %). Finalmente, se resuspendieron en 20 µl de tampón PNK que contenía 30 µCi de [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol, Perkin Elmer) y 10 unidades de T4 PNK (Promega), se incubó durante 20 minutos a 37°C en un termobloque Thermomixer a 800 rpm. A continuación, se lavó tres veces en tampón PNK sin DTT y las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10% para su análisis por PhosphorImager e inmunotransferencia.

3.2.19. Inmunoprecipitación de RNA (RIP, *RNA-Immunoprecipitation*)

Para preparar las bolitas paramagnéticas conjugadas a IgGs, se pesaron 10 mg de Dynabeads M-270 Epoxy (Thermo Scientific 14301) y se añadió 1 ml de 100 mM tampón fosfato pH 7.4. Se agitó en vortex 30 segundos y luego durante 5 minutos a temperatura ambiente en rotación. El eppendorf se colocó en el imán durante 2 minutos, se eliminó el líquido y se volvió a añadir 1 ml de tampón fosfato y a realizar el mismo proceso. Tras esto, se resuspendieron las bolitas en 250 µl de tampón fosfato, a las que se añadieron 250 µl de 1 mg/ml IgGs de conejo y, finalmente 250 µl

de 3M $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ (disuelto en tampón fosfato). Las muestras se incubaron durante 18-24 horas a 37°C con agitación orbital. Al día siguiente, se lavaron las bolitas 3 veces con PBS + 0.2 mg/ml BSA (Fluka 05490), se resuspendieron en 1 ml de 0.2 mg/ml BSA en PBS + 10 μl de 0.5M azida y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Se recogieron 1×10^9 tripomastigotes procíclicos en fase logarítmica de crecimiento y se lavaron con 10 ml de medio SDM-79 sin suero. En hielo, el precipitado se resuspendió en 1.4 ml de tampón 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% Igepal CA-630, 2 mM de *vanadyl ribonucleoside complexes* (NEB S1402S), inhibidores de proteasas (Roche, EDTA-free) y 40U/ml de RiboLock (Thermo Scientific), y la suspensión se pasó 3 veces por una aguja 27G. El lisado se centrifugó a 16.000g durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se añadió NaCl a una concentración final de 150 mM, apartando un 1% del volumen para extraer el RNA del input. Al resto se le añadió 1 mg de bolitas magnéticas preparadas como se ha indicado más arriba y lavadas previamente 3 veces con IPP-150, y se incubó durante 1 hora y 30 minutos a 4°C con agitación orbital. A continuación, las bolitas se lavaron 4 veces con IPP-150 y una vez con tampón TEV. Se resuspendieron las bolitas en 50 μl de tampón TEV y se le añadió 3 μl de TEV (Invitrogen, 10U/ μl) y 1 μl de RiboLock (ThermoFisher, 40U/ μl) y se dejó incubar durante 1 hora y 30 minutos a 18°C con agitación a 800 rpm. Finalmente, tras retirar las bolitas con un imán, se traspasó el líquido a otro tubo y se añadió 50 μl de tampón TEV y se extrajo el RNA con 100 μl de fenol:cloroformo (1:1). Se precipitó 90 μl de la fase acuosa con 9 μl de 3 M NaAc pH 5.4, 1 μl de 20 mg/ml glucógeno y 250 μl de etanol absoluto. Tras lavar con 70% etanol, se resuspendió el precipitado en 11.5 μl de agua Milli-Q.

Para la síntesis de cDNA se utilizó todo el volumen de RNA tanto para las muestras input como para los inmunoprecipitados. El protocolo para la síntesis de cDNA y la RT-PCR cuantitativa se realizó de la misma manera que el descrito en el apartado 2.2.22.

Para el cálculo del porcentaje de RNA inmunoprecipitado, seguimos la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RNA inmunoprecipitado} = 100 (\text{factor dilución del input}) * 100 (\%) * 2^{-(Cq \text{ IP} - Cq \text{ Input})}$$

3.2.20. Extracción de RNA de tripanosomas en cultivo

Se centrifugaron 25×10^6 tripomastigotes procíclicos en crecimiento exponencial a 1400g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 350 μ l del tampón de lisis del kit de extracción RNeasy Mini (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.2.21. Secuenciación masiva de RNA

Para el análisis de los transcriptomas, el RNA total de las muestras control (449) y de las muestras inducidas por RNAi (transfectadas con el plásmido pGR309) se obtuvo usando el kit RNeasy Mini (Qiagen).

Las librerías de mRNA se obtuvieron a partir de transcritos poliadenilados previamente seleccionados utilizando el protocolo estándar de preparación de muestras de TruSeq Stranded (Illumina). Los triplicados biológicos se secuenciaron en la Unidad de Genómica del IPBLN a través de la plataforma NextSeq 500 (Illumina).

Para identificar los transcritos asociados al complejo ZC3H41/Z41AP (RIP-seq), se procesaron dos purificaciones independientes a partir de líneas celulares que expresan TAP-Z41AP en paralelo con un RIP-seq del complejo PuREBP1/2 descrito en (Rico-Jiménez et al., 2021).

Se verificó la calidad de las secuencias resultantes de 76 nucleótidos mediante FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y se alinearon con la secuencia de los 11 cromosomas megabásicos de *T. brucei* (TREU927, versión 5.7) utilizando el módulo 'align' del paquete *Subread* (Rsubread versión 1.34.7, (Liao et al., 2013)) con las opciones nTrim5=4, nTrim3=1, unique=TRUE. Los coeficientes de correlación de Pearson entre réplicas fueron > 0,980 en todos los casos.

Para el análisis de expresión diferencial, la asignación de lecturas a los mRNA se realizó utilizando el programa 'featureCounts' del paquete *Subread* (versión 1.5.0-p, (Liao et al., 2014)) con los parámetros: -p -B -C -ignoreDup -Q 20. Los recuentos se analizaron utilizando *edgeR* (versión 3.36.0, (Robinson et al., 2009)); solo se consideraron los genes que contenían más de un recuento por millón de lecturas mapeadas (CPM) en al menos tres muestras. Para el análisis de correlación de Pearson, los CPM se normalizaron utilizando el método TMM (Robinson et al., 2009) y se transformaron a log₂ en *edgeR*. Para los gráficos de cobertura, las regiones de interés se agruparon y contaron (ventana deslizante, 100 pb; tamaño de paso, 10 pb) utilizando el módulo 'countReadsPerBin' de *deepTools* (versión 3.5.0, (Ramírez et al., 2016)), y se corrigieron para el tamaño de la librería.

Los datos de RIP-*seq* se analizaron usando *edgeR* como se indicó anteriormente comparando el RNA del input con el RNA de las muestras del inmunoprecipitado o el identificador de picos MACS2 (versión 2.2.7.1, (Zhang et al., 2008)). En este último caso, se usó el módulo '*callpeak*' sobre los archivos BAM obtenidos después de la alineación con el genoma de referencia; las opciones fueron -q 0.005 -g 3.5e7 -nomodel -f BAMPE. Los archivos BAM correspondientes al RNA del input se usaron como controles para el MACS2. Los archivos '*narrowPeak*' resultantes obtenidos de ambos duplicados biológicos se cruzaron usando el módulo '*intersect*' de *bedtools* (Quinlan et al., 2010) con opciones -f 0.9 -r. La lista final de picos se volvió a cruzar con un archivo BED que contenía las coordenadas de todos los genes (marcos de lectura abiertos más regiones no traducidas) presentes en los 11 megacromosomas de *T. brucei* (TREU927, versión 5.7) usando la opción -f 0.5.

El análisis de la ontología de genes (Gene Ontology (GO)) se realizó usando la base de datos de TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>).

3.2.22. RT-PCR cuantitativa

El RNA extraído de tripanosomas en cultivo se cuantificó mediante un sistema NanoDrop®. El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado a partir de 250 ng de RNA utilizando 0.5 µg de hexámeros (Invitrogen) y 0.25 mM de cada dNTP, en un volumen final de 14.5 µl. Las muestras se incubaron 5 minutos a 65°C y se les añadió 5x tampón RT (Thermo Scientific), 20 unidades de Ribolock (Thermo Scientific) y 200 unidades de Maxima reverse transcriptasa (Thermo Scientific) el un volumen final de 20 µl. Las muestras se incubaron primero 5 minutos a temperatura ambiente, después 30 minutos a 50°C y finalmente 5 min a 85°C.

El ensayo de RT-PCR cuantitativa se realizó en un termociclador CFX96 (Bio-Rad) en placas de 96 pocillos (Thermo Scientific). La reacción contenía 0.5 μ l de cDNA, 0.5 μ M de cada oligonucleótido, 1X de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) y agua Milli-Q hasta un volumen final de 10 μ l. Las condiciones del termociclador fueron: 50°C durante 2 minutos y 95°C 10 minutos, seguido de 40 ciclos [95°C, 15s; 55°C, 1 min]. Se realizó un análisis de curvas de *melting* para confirmar un solo amplicón para cada mRNA probado. Los pares de oligodesoxinucleótidos utilizados se enumeran en la Tabla 1.

Los cambios en la expresión se calcularon usando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001) utilizando el mRNA *AATP11* (Tb927.4.4730) como referencia para la normalización. Todos los experimentos de RT-PCR cuantitativa se realizaron en al menos tres réplicas biológicas independientes.

3.2.23. Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes

Se recogieron 1×10^8 células en crecimiento exponencial a 1400g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 1 ml de Trizol a temperatura ambiente y se agitó en vórtex. A continuación, se añadió 200 μ l de cloroformo y se mezcló durante 30 segundos con el vórtex. Tras 5 minutos de incubación en hielo, se centrifugó durante 3 minutos a 16.000g. Se traspasó 600 μ l de sobrenadante a un tubo limpio y se precipitó con 600 μ l de isopropanol durante 30 segundos en hielo. Se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 16.000g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 70% etanol y se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos y finalmente se resuspendió en 60 μ l de agua Milli-Q.

Se precipitaron un total de 10 µg de RNA total con 1/10 volúmenes de NaAc 3M pH 5.4, 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1 µl de 20 mg/ml glucógeno durante toda la noche a -20°C. Se centrifugó al menos durante 20 minutos a velocidad máxima a 4°C. A continuación, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar. Finalmente, se añadió 20 µl de tampón de carga al precipitado y se incubó a 37°C durante 5-10 minutos. La mezcla se agitó con el vórtex para disolver el RNA, y se incubaron las muestras durante 10 minutos a 65°C. Tras este tiempo, se enfriaron rápidamente en hielo, se centrifugaron brevemente y se cargaron en un gel de agarosa al 1% que contenía 6.5% de formaldehído, MOPS a una concentración final 1X y 0.2 µg/ml de bromuro de etidio.

La electroforesis se realizó en una cubeta horizontal durante 1 hora y 30 minutos a 90V en 1X MOPS. Las bandas correspondientes a los RNA ribosomales se visualizaron mediante luz UV.

3.2.24. Ensayo de traducción

El ensayo SUnSET (*Surface Sensing of Translation*) (Schmidt et al., 2009) se utilizó para monitorizar la traducción global de acuerdo con un procedimiento descrito para tripanosomas (Bakari-Soale et al., 2021). Se cultivaron 1×10^7 tripomastigotes procíclicos en placas de 24 pocillos, se incubaron en presencia de 10 µg/ml de puromicina durante 30 minutos a 28°C, se lavaron en medio sin suero a la misma temperatura y se sometieron a un análisis de inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente. Se incluyeron dos controles; células no tratadas con puromicina y células incubadas durante 30 minutos con 50 µg/ml de cicloheximida antes de la adición de puromicina. Los péptidos puromicinilados se detectaron con un anticuerpo anti-puromicina (Sigma, clon 12D10, 1:5000) en un Odyssey Imaging System y se cuantificaron

usando Image Studio (LI-COR Biosciences, v5.2). DRBD3, que es estable durante el transcurso del experimento (Tinti et al., 2019), se utilizó para la normalización.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. El silenciamiento de la expresión de la proteína ZC3H41 ocasiona graves defectos en el ciclo celular.

ZC3H41 es una proteína de 517 amino ácidos con una masa molecular teórica de 58.5 kDa. En su secuencia se localizan dos regiones correspondientes a dominios proteicos conocidos. El dominio de unión a RNA de dedo de zinc tipo CCCH comprende los aminoácidos 129-156 de la región amino-terminal. En el extremo carboxilo-terminal de la proteína se haya un dominio perteneciente a las superfamilias 1 y 2 de helicasas que corresponde a los aminoácidos 327-435.

Con el fin de obtener más información sobre la función de ZC3H41, se silenció *in vivo* su expresión en tripanosomas procíclicos produciendo de manera inducible RNA de doble cadena. Primero generamos una línea celular procíclica que expresaba desde el locus endógeno una versión de la proteína ZC3H41 fusionada a una etiqueta TAP en el extremo amino-terminal utilizando el plásmido pGR307. Empleando un anticuerpo frente a la etiqueta TAP, TAP-ZC3H41 se detectó como una única banda del tamaño esperado mediante inmunotransferencia (Figura 8A).

ZC3H41 es principalmente una proteína citosólica (Eliaz et al., 2017; Sunter et al., 2023). Mediante inmunofluorescencia se llevó a cabo la detección de la proteína TAP-ZC3H41, observando que la proteína etiquetada también presentó una localización en el citosol. (Figura 8B).

RESULTADOS

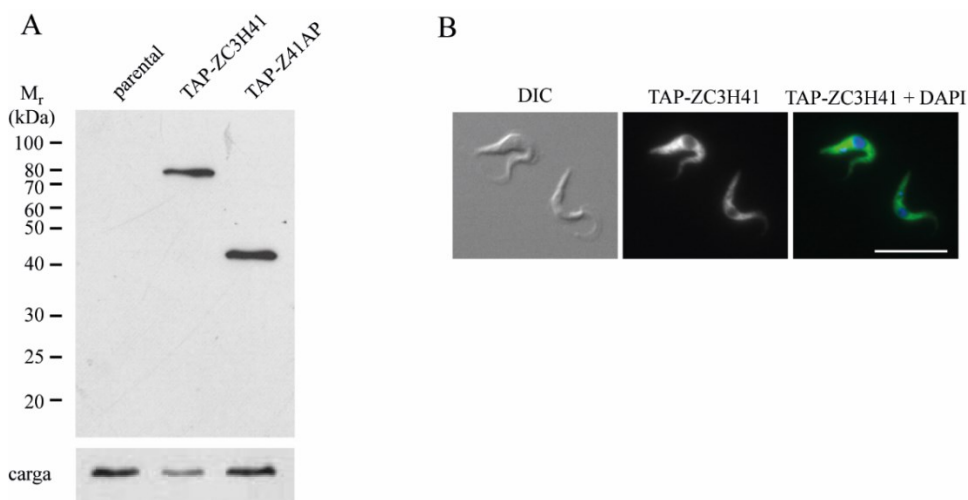


Figura 8. Localización de TAP-ZC3H41 en células silenciadas para ZC3H41. (A). Inmunotransferencia de las líneas celulares TAP-ZC3H41 y Tb927.7.7460 (Z41AP, ver más adelante) usadas en este estudio. Las proteínas etiquetadas con TAP fueron detectadas usando un reactivo anti-peroxidasa (PAP). **(B).** La localización de TAP-ZC3H41 fue analizada por inmunofluorescencia usando un antisuero anti-proteína A, el cual se une específicamente a la etiqueta TAP. Barra, 10 μ m.

Los tripanosomas que expresan la proteína ZC3H41 etiquetada con TAP se transfectaron adicionalmente con el plásmido pGR309 que produce RNA de doble cadena contra ZC3H41 de una manera inducible por tetraciclina (RNAi). Mediante inmunotransferencia se comprobó que los niveles de la proteína endógena se redujeron de manera eficiente tras 48 horas de inducción (Figura 9A).

Además, se observó una marcada reducción en el crecimiento celular. Como puede verse en la Figura 9A, el cultivo correspondiente a la inducción del RNAi muestra un crecimiento más lento comparado con el cultivo no inducido, y tras dos días los parásitos detienen su crecimiento y mueren. Estos resultados indican que ZC3H41 es esencial en tripanosomas procíclicos de acuerdo con resultados anteriores (Eliaz et al., 2017).

A continuación, decidimos analizar el fenotipo tras el silenciamiento de ZC3H41 con el fin de determinar posibles defectos morfológicos y cariotípicos en la célula mediante microscopía de fluorescencia. La tinción con DAPI permitió la visualización del DNA nuclear y el DNA del kinetoplasto mientras que la tinción con anti-EP1 se utilizó para visualizar la forma celular. De esta forma, tras 1 o 2 días de inducción del RNAi pudimos detectar células de pequeño tamaño correspondientes a parásitos sin núcleo, pero con un kinetoplasto (0N1K) que reciben el nombre de “zoides” (Figura 9B, flecha). Adicionalmente, tras tres días del silenciamiento de ZC3H41 se observaron células que mostraban un extremo alargado, conocido como fenotipo *nozzle* (Hendriks et al., 2001) (Figura 9C, asterisco).

Después de teñir su DNA, las células se clasificaron según las diferentes etapas del ciclo celular: las células con un solo núcleo y kinetoplasto (1N1K) se encuentran en fase G1 o S, las células con dos kinetoplastos y un núcleo (1N2K) están en fase G2 y las células con dos kinetoplastos y dos núcleos (2N2K) corresponden a células mitóticas. El análisis de nuestra población reveló una clara reducción de células 1N1K y un aumento de zoides (0N1K) y células multinucleadas (>2N) dependiente del tiempo, observando que tras dos días de inducción del RNAi la mayoría de las células presentaban cariotipos aberrantes (Figura 9D). Tanto la disminución en la proporción de células 1N1K como el aumento de células multinucleadas >2N se confirmó mediante citometría de flujo (Figura 9E).

RESULTADOS

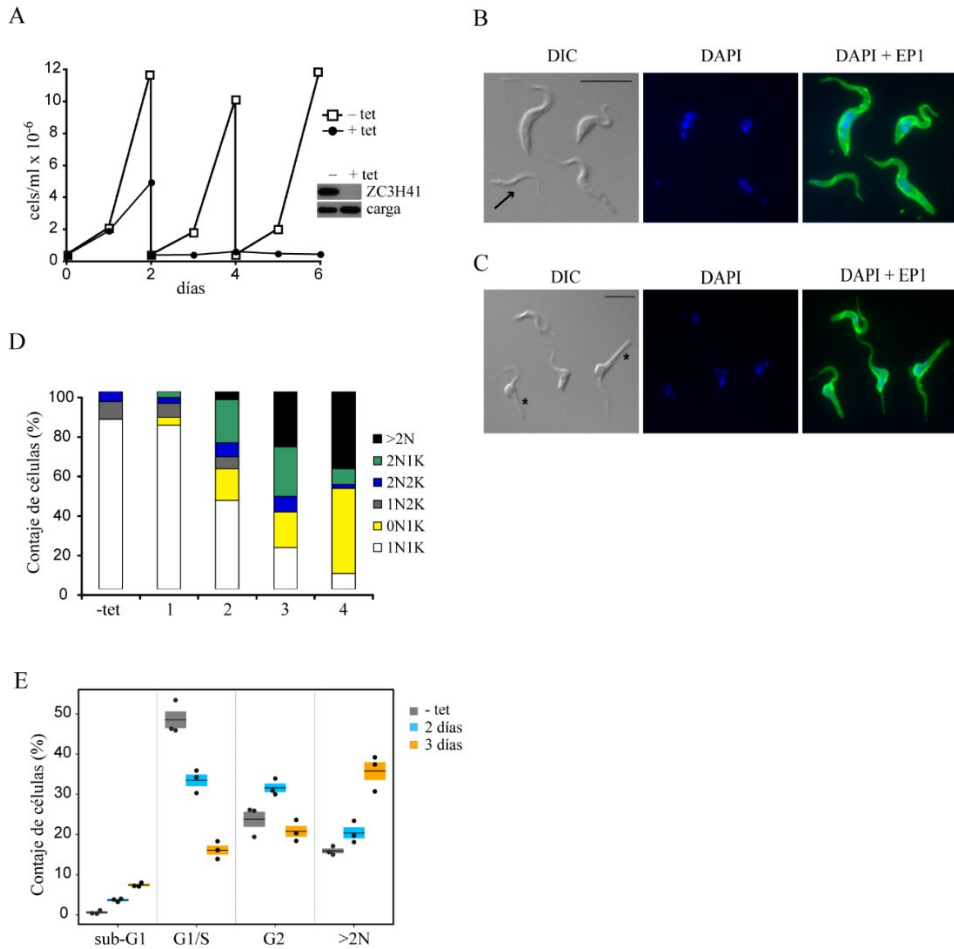


Figura 9. El silenciamiento de ZC3H41 conduce a morfologías anormales y defectos en la división celular. (A). Efecto del silenciamiento de ZC3H41 en el crecimiento celular. Las células que expresan TAP-ZC3H41 se transfectaron con un plásmido que expresa dsRNA correspondiente a ZC3H41 de forma inducible por tetraciclina. Los cultivos celulares se siguieron durante un máximo de seis días y se diluyeron cada dos días. El silenciamiento de TAP-ZC3H41 se confirmó mediante inmunotransferencia después de dos días de inducción con tetraciclina (recuadro). Como control de carga se utilizó RRP4. **(B-C).** Análisis de la morfología celular tras el silenciamiento de ZC3H41 inducido por RNAi durante 2 (B) o 3 (C) días con tetraciclina. Las células se incubaron con un anticuerpo anti-EP1 para facilitar su visualización y se montaron en medio con DAPI. Barra, 10 μ m. Con una flecha se indica un zoide en (B); las células que exhiben el fenotipo *nozzle* se indican con asteriscos en (C). **(D).** Las configuraciones de núcleo (N) y

kinetoplasto (K) de células individuales se analizaron mediante tinción con DAPI. Se muestra el porcentaje de células fisiológicas (1N1K, 1N2K y 2N2K) o aberrantes (0N1K, 2N1K y >2N) para células no inducidas (- tet) o tras la inducción del silenciamiento de ZC3H41 durante 1, 2, 3 o 4 días con tetraciclina. **(E)**. Análisis del ciclo celular de células no inducidas (-tet) o sin ZC3H41 inducidas durante 2 o 3 días con tetraciclina. Los porcentajes de células en fase sub-G1, G1/S o G2, así como las que tienen más de dos núcleos (>2N), se expresan como la media (líneas horizontales) \pm S.E.M. (áreas sombreadas) de tres inducciones independientes de RNAi (puntos).

Para descartar que el fenotipo observado se produzca porque la ribointerferencia esté afectando a otros mRNAs además de ZC3H41 (efectos *off-target*), generamos un nuevo plásmido (pGR440) donde clonamos un fragmento diferente no solapante del gen para silenciar la expresión de ZC3H41 por RNAi. Mediante inmunotransferencia se detectó una reducción significativa de los niveles de la proteína endógena tras 48 horas de inducción con tetraciclina (Figura 10A), acompañado de una destacada reducción del crecimiento celular. Igualmente, en el examen microscópico también se observaron la aparición de zoides, células con fenotipo *nozzle* y células multinucleadas (Figura 10B).

Todos estos resultados confirmaron que la ausencia de ZC3H41 produce graves defectos en el ciclo celular.

RESULTADOS

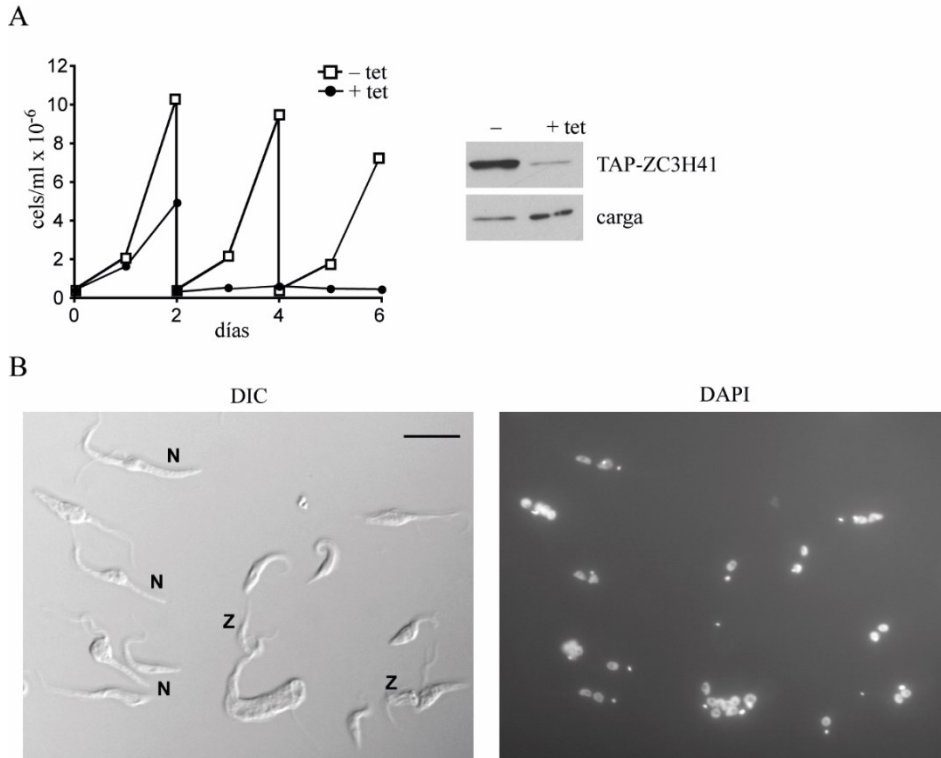


Figura 10. Ribointerferencia de ZC3H41 usando un dsRNA diferente. Las células que expresan TAP-ZC3H41 se transfectaron con un plásmido diferente de RNAi inducible por tetraciclina. **(A).** Curva de crecimiento de tripanosomas no inducidos (-tet) o inducidos por RNAi (+tet). **(B).** Los tripanosomas en los que la expresión ZC3H41 se había silenciado se visualizaron con medio de montaje que contenía DAPI y se analizaron para detectar la aparición de zoides (Z) y *nozzles* (N).

4.2. Identificación de proteínas asociadas a ZC3H41

Se empleó el método de purificación por afinidad en tándem (TAP) seguido de un ensayo de espectrometría de masas para evaluar si ZC3H41 se une a otras proteínas en la célula. Para ello, se utilizó la línea celular procíclica anteriormente generada que expresa desde el locus endógeno la proteína ZC3H41 fusionada a una etiqueta TAP en el extremo amino-terminal. Como control, se realizó una purificación en paralelo utilizando

un extracto de proteína obtenido de una línea celular que expresa la etiqueta TAP sola.

Los resultados revelaron que ZC3H41 se encuentra asociada en aparente estequiometría con una proteína de 22 kDa, Tb927.7.7460 (Figura 11A y Tabla 6), a la que nombramos Z41AP (proteína asociada a ZC3H41).

GeneID	Descripción	MW	Puntuación	Nº. de péptidos identificados
Tb927.1.120	RHS4	98	76	3
Tb927.10.2240	NTF-2 <i>like</i>	66	101	4
Tb927.11.1980	ZC3H41	58	285	5
Tb927.6.1870	eIF4E4	47	83	6
Tb927.5.2080	GMP reductasa	52	140	n.a.
Tb927.9.9290	PABP1	53	140	3
Tb927.9.10770	PABP2	62	64	4
Tb927.3.5050	Proteína ribosomal L4	42	126	n.a.
Tb927.10.5620	Aldolasa	41	186	4
Tb927.5.1110	Proteína ribosomal L2	28	160	n.a.
Tb927.10.5610	Proteína ribosomal S9	22	69	2
Tb927.7.7460	Proteína hipotética, conservada (Z41AP)	22	105	6
Tb927.11.6500	Proteína ribosomal S21	21	63	2
Tb927.11.6300	Proteína ribosomal S5	21	105	n.a.
Tb927.1.3180	Proteína ribosomal S11	20	85	n.a.

Tabla 6. Lista de proteínas asociadas a ZC3H41. Las proteínas copurificadas con TAP-ZC3H41 se extrajeron de geles SDS-PAGE, se sometieron a análisis MALDI-TOF y se identificaron mediante el software MASCOT. Se muestran las puntuaciones de Mowse basadas en la probabilidad de MASCOT; las puntuaciones > 51 se consideran estadísticamente significativas ($p < 0,05$). La identidad de algunas de las proteínas

RESULTADOS

asociadas se confirmó mediante análisis MALDI TOF/TOF; el número de péptidos identificados se indica en la última columna (n.a., no analizado por MALDI TOF/TOF).

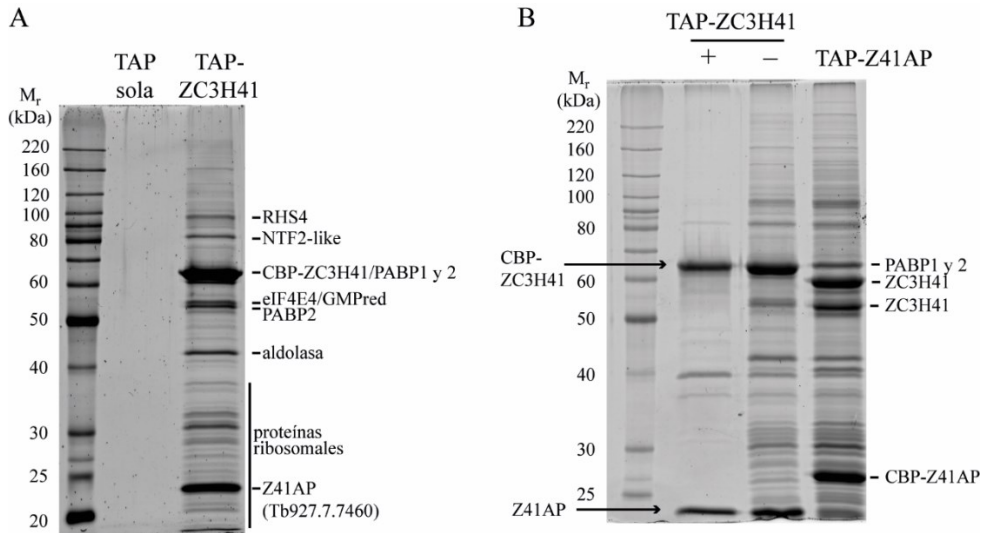


Figura 11. Identificación de las proteínas asociadas a ZC3H41 por purificación en tándem por afinidad. (A-B). Tinción SDS-PAGE/SYPRO de purificaciones de afinidad en tándem usando como cebo la proteína TAP sola, TAP-ZC3H41 o TAP-Z41AP. 'CBP' se refiere a la etiqueta del péptido de unión a calmodulina que permanece después de la digestión de la proteasa TEV. Se indican las proteínas identificadas por espectrometría de masas. Las purificaciones de TAP-ZC3H41 realizadas en ausencia (-) o presencia (+) de RNasas A y T1 se muestran en (B).

Z41AP es principalmente una proteína citosólica (Sunter et al., 2023), que contiene un motivo conservado SKP1. Este motivo se encuentra en la proteína asociada a la quinasa de fase S de organismos eucariotas, un componente del complejo proteico ubiquitina ligasa (McKean, 2003). Z41AP también fue detectada tras la purificación por afinidad de SL-RNA (Eliaz et al., 2017), denominada p22 en ese estudio. Por tanto, decidimos realizar un TAP recíproco usando Z41AP como cebo, donde obtuvimos un patrón de proteína muy similar, siendo ZC3H41 la

banda más predominante en este caso (Figura 11B). La mayoría de las interacciones proteicas se perdieron cuando el lisado celular se trató con una mezcla de RNasas A y T1 (Figura 11B). Sin embargo, la asociación de ZC3H41 con Z41AP fue resistente a la digestión con RNasas (Figura 11B). Además, ambas proteínas permanecieron asociadas entre sí en presencia de una alta concentración de sal (ver más abajo) y según estudios proteómicos (Tinti et al., 2022; Ferguson et al., 2022) se encuentran aproximadamente en los mismos niveles dentro de la célula (Figura 12A). Estos resultados claramente sugieren que ZC3H41 y Z41AP forman un heterodímero estable *in vivo*.

ZC3H41 también apareció asociada en menor medida con las proteínas de unión a poli(A), PABP1 y PABP2, con el factor de traducción eIF4E4 y con varias proteínas ribosomales tanto de la subunidad grande como de la subunidad pequeña (Tabla 6). La presencia de proteínas ribosomales en las fracciones purificadas sugiere una asociación con los ribosomas; de hecho, en estudios anteriores se ha encontrado a ZC3H41 asociado con polisomas en *T. brucei* (Klein et al., 2017). No obstante, puede tratarse simplemente de una asociación espúrea, ya que las proteínas ribosomales son típicos contaminantes de las purificaciones de otras proteínas (Ouna et al., 2012). En cualquier caso, la pérdida de interacción con ambas PABPs y con las proteínas ribosomales cuando se trató el lisado celular con RNasas, indica que la asociación de ZC3H41 a estas proteínas es dependiente de RNA (Figura 11B).

A partir de un estudio realizado sobre la abundancia diferencial de proteínas entre la forma sanguínea y procíclica del parásito donde las proteínas fueron ordenadas en función a sus valores de abundancia (Tinti et al., 2019), extrajimos las cuantificaciones absolutas basadas en la

RESULTADOS

intensidad de ZC3H41, Z41AP y cada una de las proteínas asociadas al complejo. El análisis de estos datos nos informó que ZC3H41 y Z41AP se encuentran en exceso con respecto a PABP1 y eIF4E4 (Figura 12A). Por tanto, estos resultados sugieren que, aunque ZC3H41 y Z41AP parecen asociarse con los complejos PABP, es probable que el heterodímero ZC3H41/Z41AP también exista como una especie libre. Además, como se observa en la Figura 12B, ZC3H41 y Z41AP se encuentran en mayor abundancia en comparación con todas las proteínas con dedos de zinc tipo CCCH en *T. brucei*.

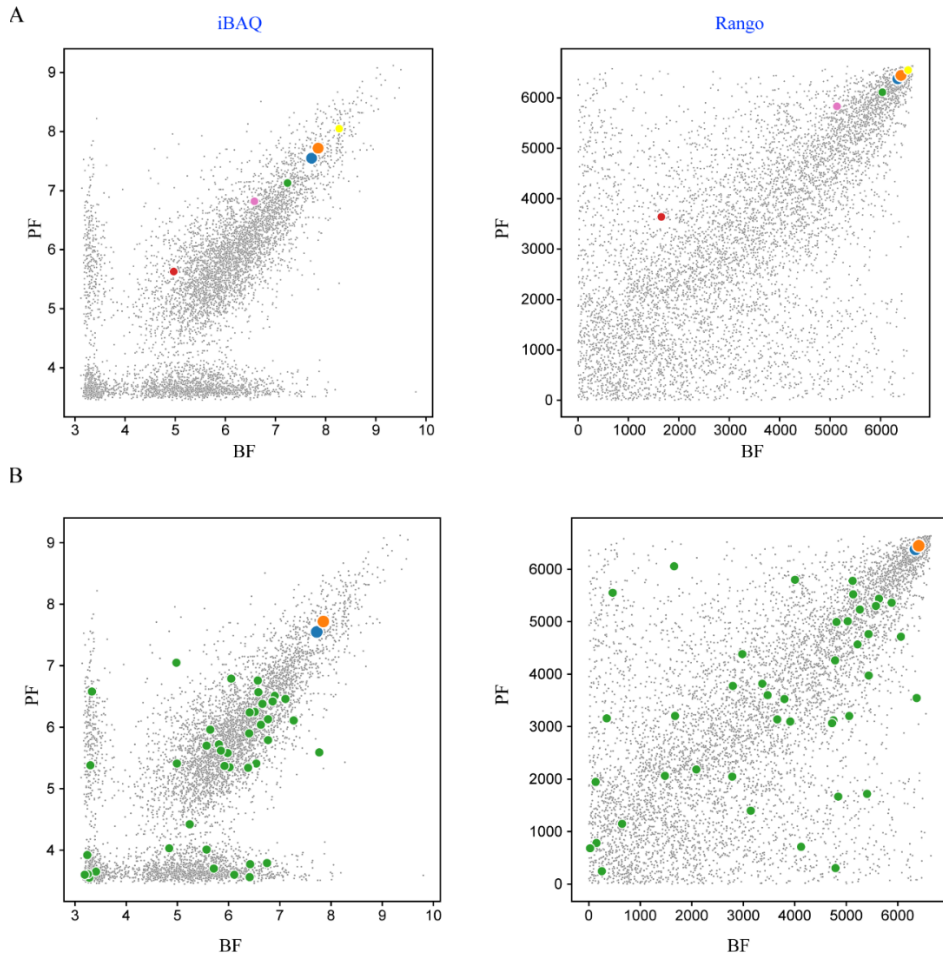


Figura 12. Abundancia de las proteínas ZC3H41 y Z41AP. Los datos del estudio del proteoma realizado en cepas 927 de tripanosomas sanguíneos (BF) y tripanosomas procíclicos (PF) (Tinti et al., 2019) se representaron en función de los valores iBAQ (cuantificación absoluta basada en la intensidad) de la proteína (gráficos de la izquierda) o las posiciones según el rango de abundancia de la proteína desde la menor (rango = 1) a la más abundante (rango = 6643) (gráficos de la derecha). Cada punto representa una proteína. **(A)** Componentes del complejo PABP1 (PABP2 se muestra como referencia): Z41AP (naranja); ZC3H41 (azul); PABP1 (verde); PABP2 (amarillo); eIF4E4 (rosa); RBP23 (rojo). **(B)** Las proteínas de dedos de zinc de clase CCCH de *T. brucei* se representan como círculos verdes, excepto ZC3H41 (azul). Z41AP (naranja) se muestra como referencia.

4.3. Z41AP es esencial en tripanosomas procíclicos

Z41AP es una proteína de 192 amino ácidos con una masa molecular teórica de 22 kDa. Como se ha mencionado anteriormente, su secuencia contiene un motivo SKP1 presente en uno de los componentes que forman el complejo proteico ubiquitina ligasa (McKean, 2003). Sin embargo, en la base de datos TriTrypDB, Z41AP se encuentra anotada como una proteína de función desconocida.

Con el fin de obtener más información sobre la función de Z41AP, generamos una línea celular procíclica que expresaba desde el locus endógeno una versión de la proteína fusionada a una etiqueta TAP en el extremo amino-terminal utilizando el plásmido pGR315. TAP-Z41AP se detectó como una única banda del tamaño esperado mediante inmunotransferencia (Figura 8A).

Z41AP es una proteína citosólica (Sunter et al., 2023). Mediante inmunofluorescencia se llevó a cabo la detección de la proteína TAP-Z41AP, observando una localización en el citosol, al igual que la proteína Z41AP endógena (Figura 13A).

A continuación, se silenció *in vivo* la expresión de Z41AP con el plásmido pGR318 que produce ribointerferencia (RNAi). El silenciamiento de la expresión de Z41AP condujo a una inhibición del crecimiento celular tras 48 horas de inducción del RNAi con tetraciclina (Figura 13B), lo que indica que, al igual que ZC3H41, Z41AP también es esencial en tripanosomas procíclicos.

Siguiendo la misma estrategia, decidimos analizar mediante microscopía de fluorescencia posibles defectos morfológicos en el parásito tras el silenciamiento de Z41AP, observando una baja proporción de

zoides tras 1 o 2 días de inducción del RNAi, y ausencia de células con fenotipo *nozzle* después de 3 días de inducción. Los resultados obtenidos por citometría de flujo, confirmaron que, a diferencia del RNAi de ZC3H41, el silenciamiento de Z41AP produjo defectos mínimos en el ciclo celular (Figura 13C), mostrando un ligero aumento de células en fase sub-G1 (correspondiente a células 0N1K o zoides) y una reducción de células en fase G1/S (1N1K). Tampoco se observaron cambios en la proporción de células multinucleadas (>2N) en los cultivos inducidos dos o tres días con tetraciclina comparado con los cultivos no inducidos (Figura 13C).

Para estudiar si el silenciamiento de ZC3H41 tenía efecto sobre los niveles de Z41AP y viceversa, generamos una línea celular que expresaba ambas proteínas con una etiqueta diferente, 4xTy-ZC3H41 y TAP-Z41AP. La línea celular resultante se transfectó con los plásmidos para RNAi dirigidos contra ZC3H41 o Z41AP y tras 48 horas de inducción con tetraciclina se cuantificó por inmunotransferencia los niveles de proteína. Como se muestra en la Figura 13D, el silenciamiento independiente de ZC3H41 o Z41AP no tuvo efecto alguno sobre los niveles de la correspondiente proteína asociada. Estos resultados indican que ambas proteínas son estables como especies libres dentro de la célula.

RESULTADOS

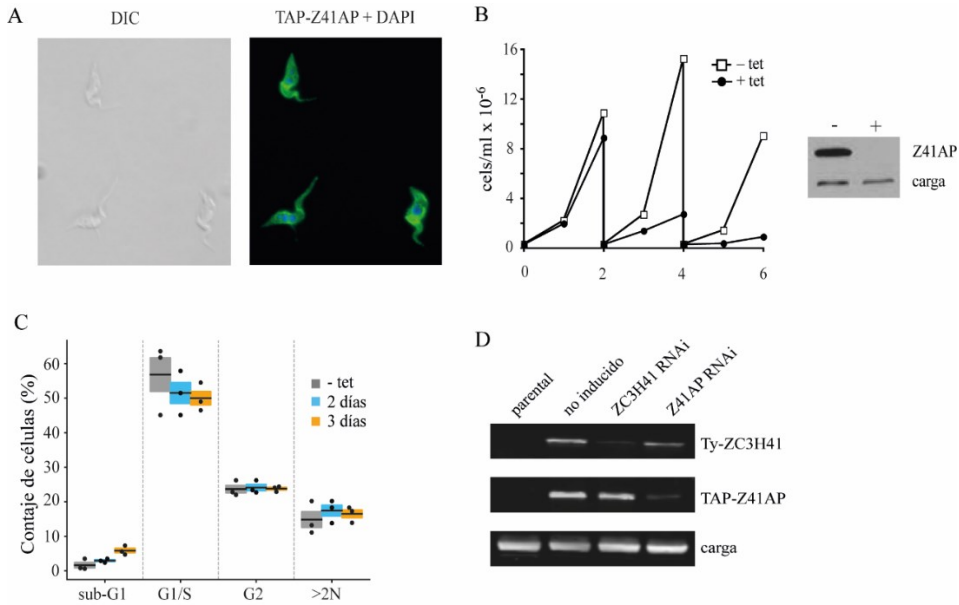


Figura 13. Efecto del silenciamiento de Z41AP. (A). La localización de TAP-Z41AP fue analizada por inmunofluorescencia usando un antisuero anti-proteína A, el cual se une específicamente a la etiqueta TAP. Barra, 10 μ m. (B). Curva de crecimiento de tripanosomas no inducidos (-tet) o inducidos por RNAi (+tet). Se transfectó una línea celular que expresaba TAP-Z41AP con un plásmido que producía dsRNA correspondiente a Tb927.7.7460 (Z41AP) de forma dependiente de tetraciclina. Los cultivos celulares se siguieron durante un máximo de seis días y se diluyeron cada dos días. El silenciamiento de Z41AP se confirmó mediante inmunotransferencia después de dos días de inducción con tetraciclina; RRP4 se utilizó como control de carga. (C). Análisis del ciclo celular de células no inducidas (-tet) o inducidas (+tet) durante 2 o 3 días con tetraciclina. Los porcentajes de células en fase sub-G1, G1/S o G2, así como las que tienen más de dos núcleos (>2N), se expresan como la media (líneas horizontales) \pm S.E.M. (áreas sombreadas) de tres inducciones independientes de RNAi (puntos). (D). Efecto del silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP en los niveles de la correspondiente proteína asociada. Se transfectó una línea celular que expresaba tanto 4xTy-ZC3H41 como TAP-Z41AP con plásmidos que expresaban dsRNA correspondiente a ZC3H41 o Z41AP. Los niveles de proteína se visualizaron mediante inmunotransferencia utilizando antisueros anti-BB2 o anti-proteína A que detectan las etiquetas 4xTy o TAP, respectivamente. Se usó α -tubulina como control de carga.

4.4. ZC3H41 y Z41AP son proteínas de unión a RNA

Estudios anteriores han demostrado que ZC3H41 y Z41AP se encuentran asociadas al SL-RNA (Eliaz et al., 2017). Además, ambas proteínas se detectaron en un estudio del proteoma unido a mRNAs en tripanosoma (Lueong et al., 2016), lo que sugiere un posible papel como proteínas de unión a RNA.

Para validar que ZC3H41 y Z41AP pueden unirse al RNA *in vivo*, los tripanosomas que expresan TAP-ZC3H41 o TAP-Z41AP fueron irradiados con luz ultravioleta para permitir la unión covalente de las proteínas de unión a RNA con los transcritos que tuvieran asociados. A continuación, se procedió a la inmunoprecipitación de los complejos de ribonucleoproteína ZC3H41/Z41AP como se describe en el apartado 2.18 de Materiales y Métodos. De forma paralela, se realizó una purificación utilizando las líneas celulares que expresan la etiqueta TAP sola o TAP-DRBD3. Esta última fue identificada previamente en nuestro laboratorio como una proteína de unión a RNA (Fernández-Moya et al., 2012). Por tanto, estas líneas fueron usadas en el ensayo como control negativo o positivo, respectivamente. Posteriormente se procedió al lavado de los complejos inmunoprecipitados con un alto contenido de sal (1M NaCl) para permitir la eliminación de los RNAs unidos de forma inespecífica. Finalmente, los RNAs asociados se marcaron con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en el extremo 5' mediante la acción de la T4 PNK y se procedió a su visualización.

Como se esperaba, no se detectó ninguna señal o tan solo un leve marcaje en las muestras no irradiadas o en la línea celular que expresaba la etiqueta TAP sola, mientras que en el control positivo TAP-DRBD3 se

RESULTADOS

visualizó una prominente banda tras la irradiación con luz UV correspondiente al complejo RNP de DRBD3 (Figura 14A).

En el caso de nuestras líneas de estudio, como se muestra en la Figura 14B (panel de la izquierda), se pudieron observar bandas claramente marcadas con ^{32}P en las células tratadas con luz UV que corresponden a RNAs unidos a ZC3H41 o Z41AP. Mediante inmunotransferencia confirmamos que el tamaño de las bandas marcadas era el esperado y corresponden a nuestras proteínas de interés (Figura 14B, panel de la derecha). Estos resultados indican que ZC3H41 y Z41AP son realmente proteínas de unión a RNA.

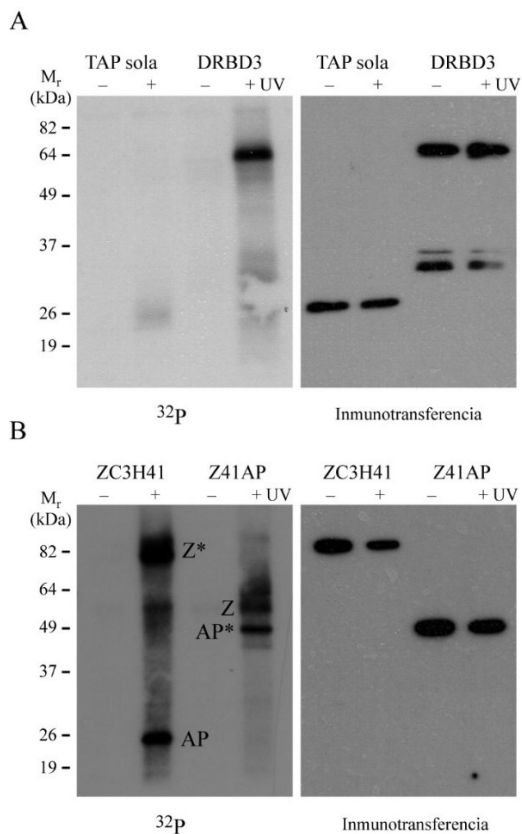


Figura 14. ZC3H41 y Z41AP se unen al RNA *in vivo*. Las líneas celulares que expresan TAP-DRBD3, TAP-ZC3H41, TAP-Z41AP o la etiqueta TAP sola se irradiaron

(+) o no (-) con luz UV. Las proteínas etiquetadas con TAP se inmunoprecipitaron usando bolitas magnéticas acopladas a IgGs, se marcaron en el extremo 5' con [γ - 32 P]ATP y polinucleótido quinasa (PNK) y se sometieron a su detección mediante SDS-PAGE y PhosphorImager (paneles izquierdos, 32 P). Las proteínas etiquetadas con TAP también se visualizaron mediante inmunotransferencia utilizando el reactivo PAP (paneles de la derecha, 'Inmunotransferencia'). **(A)**. Los tripanosomas que expresan la etiqueta TAP sola o TAP-DRBD3 se usaron como control negativo o positivo, respectivamente; las bandas por debajo de TAP-DRBD3 probablemente representan productos de degradación. **(B)**. Inmunoprecipitación y marcaje con PNK de células que expresan TAP-ZC3H41 (Z) o TAP-Z41AP (AP). Las especies etiquetadas con TAP se indican con asteriscos.

4.5. El silenciamiento de la expresión de la proteína ZC3H41 produce pocos cambios en el transcriptoma de los tripanosomas procíclicos

Para conocer mejor la función de ZC3H41, se analizó mediante secuenciación masiva (RNA-seq) de forma global el transcriptoma de células donde se silenció la expresión de la proteína ZC3H41 tras dos días de inducción del RNAi y se comparó con el transcriptoma de las células control. Los datos de RNA-seq obtenidos en esta tesis doctoral se encuentran disponibles en el repositorio GEO (*Gene Expression Omnibus*) con el número de acceso GSE213007.

Realizamos un análisis de expresión diferencial para buscar qué genes se encontraban regulados por ZC3H41 de manera significativa. El análisis de las lecturas se llevó a cabo con edgeR considerando solo aquellos genes cuya expresión se vio aumentada o disminuida al menos dos veces ($\log_2 |\text{fold-change}| \geq 1,0$) y cuya tasa de descubrimiento falso fuera inferior al 1% (FDR < 0,01).

En la Figura 15A se muestra un gráfico de volcán donde se indican los genes diferencialmente expresados en la línea RNAi de ZC3H41. Solo 44 transcritos se expresaron diferencialmente, incluido el mRNA que codifica ZC3H41, como se esperaba (Figuras 15A, 15B y Tabla 7). De

RESULTADOS

entre ellos, 19 representados en el gráfico con puntos azules corresponden a transcritos regulados a la baja, mientras que los 25 restantes, representados como puntos naranjas, corresponden a transcritos regulados al alza (Figura 15A). En general, observamos que los transcritos regulados por ZC3H41 parecen expresarse en niveles bajos y casi la mitad de ellos (43%) probablemente sean genes no codificantes, ya que las proteínas correspondientes no se han detectado en estudios proteómicos (Tabla 7). Además, algunos mRNAs regulados diferencialmente por ZC3H41 también están regulados diferencialmente tras el silenciamiento de otras proteínas (Tabla 8), por lo que probablemente el cambio de expresión de estos genes sea inespecífico debido a la reducción del crecimiento de los parásitos producido por el silenciamiento de ZC3H41.

Un transcrito que codifica una trans-sialidasa (Tb927.11.11410) se vio claramente regulado al alza en células sin ZC3H41 comparado con las células control (Figura 15A, 15C y Tabla 7). Las proteínas trans-sialidasas son enzimas de membrana ampliamente descritas en tripanosoma como factores de virulencia, utilizadas para obtener ácido siálico del huésped e incorporarlo a las glicoproteínas de la superficie celular (Ammar et al., 2013). Este transcrito se expresa a muy bajos niveles en células procíclicas (Figura 15C). Curiosamente, el gen correspondiente se encuentra en orientación inversa dentro de una unidad transcripcional policistrónica (Figura 15C), y la trans-sialidasa codificada parece expresarse al menos en formas sanguíneas, a juzgar por análisis de espectrometría de masas (Ferguson et al., 2022; Urbaniak et al., 2012). Por último, mediante RT-PCR cuantitativa confirmamos la regulación negativa de ZC3H41 y la regulación positiva de la trans-sialidasa (Figura 15D).

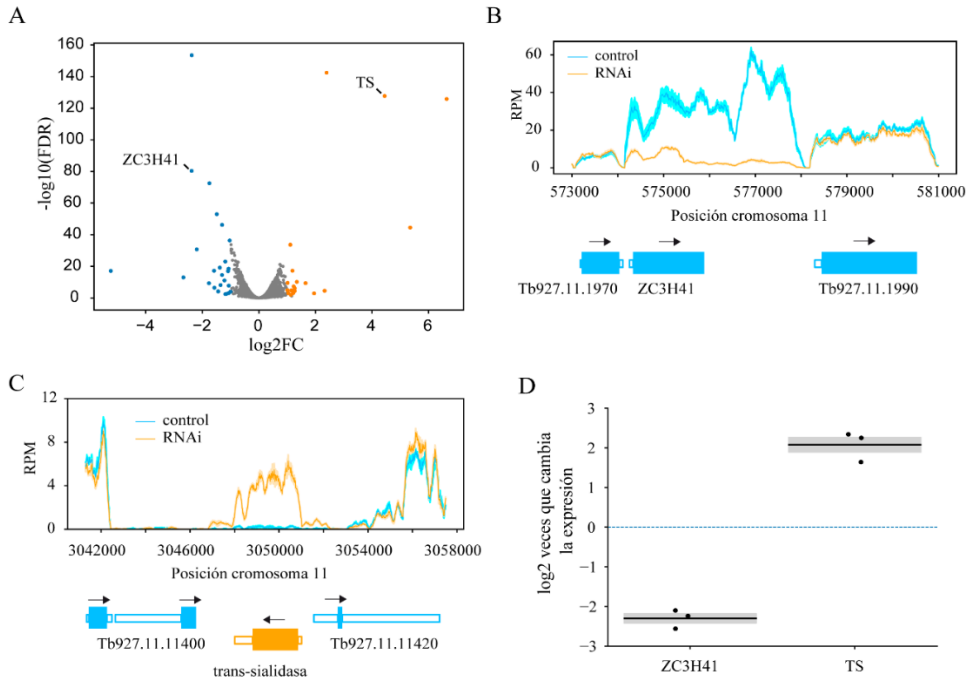


Figura 15. Efecto del silenciamiento de la expresión de ZC3H41 en el transcriptoma de *T. brucei*. (A). Gráfico de volcán de la expresión génica diferencial en células donde la expresión de ZC3H41 se silenció en comparación con las células control. Los puntos azules corresponden a transcritos regulados a la baja, los puntos naranjas corresponden a transcritos regulados al alza y los puntos grises representan mRNAs no regulados. Se estableció un $\log_2 |\text{fold-change}| \geq 1,0$ y una tasa de descubrimiento falso (FDR) $< 0,01$ como umbrales para establecer la abundancia diferencial. (B-C). Gráficos de cobertura de los loci ZC3H41 y Tb927.11.11410. Los recuentos de lectura se analizaron utilizando ventanas deslizantes (con ‘bins’ de 100 pb, cada 10 pb) y se normalizaron según el tamaño de las librerías (lecturas por millón, RPM). Los marcos abiertos de lectura se representan como cajas gruesas rellenas, las regiones no traducidas como cajas finas y abiertas y las flechas indican la dirección de la transcripción. Los valores de RPM se representan como la media (líneas continuas) \pm S.E.M. (área sombreada) de tres réplicas biológicas de RNA-seq. (D). Análisis cuantitativo de RT-PCR para confirmar la regulación negativa del mRNA de ZC3H41 y la regulación positiva del mRNA de trans-sialidasa (TS). Los cambios de expresión (convertidos a \log_2) se expresan como la media (líneas horizontales) \pm S.E.M. (áreas sombreadas) de tres inducciones independientes de RNAi (puntos) en tripanosomas procíclicos. La línea discontinua horizontal indica $\log_2=0$, es decir, sin cambios en la expresión génica.

RESULTADOS

GeneID	Descripción	logFC	logCPM	P-Valor	FDR	Proteína detectada por MS
Tb927.7.6880	proteína hipotética, conservada	6.6	3.1	7.65E-130	1.50E-126	No
Tb927.2.1460	proteína hipotética, conservada	5.3	1.2	3.44E-48	2.99E-45	No
Tb927.11.1410	trans-sialidasa, putativa	4.4	5.3	7.48E-132	1.95E-128	Yes
Tb927.5.340	proteína del gene 5 asociado al sitio de expresión (ESMG5), putativa	2.4	6.1	9.31E-147	3.64E-143	Yes
Tb927.1.2360	alfa tubulina	2.3	1.5	1.76E-06	2.71E-05	Yes
Tb927.1.2380	alfa tubulina	2.0	1.0	0.00015032	0.00122255	Yes
Tb927.2.2060	glicoproteína variante de superficie (VSG)-relacionada, putativa	1.7	1.9	8.76E-12	4.27E-10	Yes
Tb927.6.760	4.6.1.1 (Adenilato ciclasa)	1.3	2.5	1.12E-12	6.55E-11	No
Tb927.2.5320	proteína hipotética, conservada	1.3	1.5	2.98E-08	6.98E-07	No
Tb927.8.6650	proteína de unión a RNA, putativa (DRBD13)	1.3	4.8	2.63E-06	3.81E-05	Yes
Tb927.11.12710	glicoproteína variante de superficie (VSG)-asociada, putativa	1.2	5.2	1.46E-09	4.57E-08	No
Tb927.10.3410	proteína hipotética	1.2	0.5	9.29E-05	0.00081558	No
Tb927.5.2966	proteína hipotética	1.2	5.6	4.06E-20	5.99E-18	No
Tb927.2.2015	proteína hipotética	1.2	1.2	9.92E-07	1.67E-05	No
Tb927.1.2350	beta tubulina	1.1	1.2	0.00175404	0.00954044	Yes
Tb927.9.4500	proteína de choque térmico, putativa	1.1	8.5	3.49E-37	2.27E-34	Yes
Tb927.10.1870	proteína ribosomal LSU, mitocondrial, putativa	1.0	0.8	0.0001042	0.00086874	Yes
Tb927.7.6580	proteína hipotética	1.0	3.5	5.61E-12	2.85E-10	No
Tb927.1.4650	proteína 2 de caja F similar a la ciclina	1.0	6.0	6.72E-07	1.15E-05	Yes
Tb927.10.5730	proteína hipotética	-1.0	3.8	8.48E-06	0.00010286	No
Tb927.10.280	subunidad VI citocromo oxidasa	-1.0	8.4	5.98E-40	4.67E-37	Yes
Tb927.6.540	gen asociado al gen 2 asociado a la expresión (GRISAG2), putativo	-1.1	0.6	8.83E-05	0.00077991	Yes
Tb927.9.15930	GTPasa pequeña, putativa	-1.1	2.9	4.43E-10	1.53E-08	Yes
Tb927.8.4895	proteína hipotética	-1.1	5.3	1.57E-21	3.23E-19	No
Tb927.10.6510	Chaperonina HSP60, precursora mitocondrial	-1.1	7.3	7.30E-20	1.00E-17	Yes
Tb927.4.170	proteína hipotética	-1.1	0.3	0.00033877	0.00244487	No
Tb927.3.570	proteína del gene 2 asociado al sitio de expresión (ESMG2), putativa	-1.2	0.8	0.00053447	0.00358574	Yes
Tb927.3.3270	2.7.1.1 (6-fosfoructokinasa)	-1.2	8.9	2.73E-26	9.28E-24	Yes
Tb927.8.490	proteína hipotética	-1.2	3.7	1.24E-13	8.30E-12	No
Tb927.11.10060	6.3.4.15 (Biotina-proteína transportadora de carboxilo de biotina) ligasa)	-1.3	8.7	6.04E-50	5.90E-47	Yes
Tb927.1.4970	proteína hipotética	-1.3	3.8	2.78E-17	2.94E-15	No
Tb927.7.2980	Familia de nitroreductasa, putativo	-1.4	5.4	1.85E-10	6.74E-09	Yes
Tb927.7.3020	Familia de nitroreductasa, putativo	-1.4	5.8	3.11E-22	6.75E-20	Yes
Tb927.7.180	Domnio tripanosómico VSG que contiene proteína, putativo	-1.4	0.2	5.56E-06	7.01E-05	Yes
Tb927.6.510	GPEET proteínica	-1.5	12.0	8.91E-57	9.95E-54	No
Tb927.7.310	Prostaglandina E sintasa, putativa	-1.6	3.0	1.35E-08	3.51E-07	Yes
Tb927.6.580	proteína del gen 3 asociado a proteínica (PAG3)	-1.6	3.2	4.50E-20	6.22E-18	No
Tb927.8.430	3.1.3.4 (Fosfatidato fosfatasa)	-1.7	6.6	2.20E-76	2.87E-73	Yes
Tb927.7.170	proteína del gen 9 asociado al sitio de expresión (ESMG9), putativa	-1.8	0.7	1.02E-11	4.87E-10	Yes
Tb927.8.510	proteína hipotética	-2.2	2.8	3.48E-94	1.95E-31	No
Tb927.3.590	Transportador de adenosina, putativo	-2.4	7.5	4.25E-158	3.32E-154	Yes
Tb927.11.1980	membro de la familia de proteínas con dedos de zinc, putativo	-2.4	7.9	2.75E-84	4.30E-81	Yes
Tb927.5.150	proteína hipotética, conservada	-2.7	0.3	1.16E-15	1.01E-13	No
Tb927.9.720	proteína hipotética, conservada	-5.2	-0.6	5.22E-20	7.42E-18	No

Tabla 7. Efecto del silenciamiento de ZC3H41 en el transcriptoma de *T. brucei*. La expresión génica diferencial se analizó utilizando edgeR. Los transcritos que mostraron una tasa de descubrimiento falso (FDR) < 0,01 y un $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1,0$ se consideraron significativamente regulados. El transcrito que codifica ZC3H41 está resaltado en azul. Los datos de espectrometría de masas (MS) se obtuvieron de <https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>.

GeneID	Descripción	RP10	CSD1	CSD2	AMPK	ZC3H45	DRBD18	ZC3H12	ORC1	NMD3
Tb927.7.6880	proteína hipotética, conservada									2.2
Tb927.2.1460	proteína hipotética, conservada									3.0
Tb927.1.11410	trans-sialidasa, putativa									
Tb927.5.340	proteína del gene 5 asociado al sitio de expresión (ESAG5), putativa									
Tb927.1.2360	alfa tubulina									
Tb927.1.2380	alfa tubulina									
Tb927.2.2060	glicoproteína variante de superficie (VSG)-relacionada, putativa	1.6	1.9		1.2					1.6
Tb927.6.760	4.6.1.1 (Adenilato ciclasa)									
Tb927.2.5320	proteína hipotética, conservada									
Tb927.8.6650	proteína de unión a RNA, putativa (DRBD13)						1.9			
Tb927.1.12710	glicoproteína variante de superficie (VSG)-asociada, putativa	1.3	3.1	1.3	2.9	2.0				
Tb927.10.3410	proteína hipotética									
Tb927.5.2965	proteína hipotética									
Tb927.2.2015	proteína hipotética									
Tb927.1.2350	beta tubulina									
Tb927.9.4500	proteína de choque térmico, putativa									
Tb927.10.1870	proteína ribosomal LSU, mitocondrial, putativa						1.3			
Tb927.7.6580	proteína hipotética									
Tb927.1.4650	proteína 2 de caja F similar a la ciclina									
Tb927.10.5730	proteína hipotética						1.6			
Tb927.10.280	subunidad VI citocromo oxidasa									
Tb927.6.540	gen asociado al gen 2 asociado al sitio de expresión (GRSAG2), putativo									-1.5
Tb927.9.15930	GTPasa pequeña, putativa									
Tb927.8.4895	proteína hipotética						-1.3			
Tb927.10.6510	Chaperonina HSP60, precursora mitocondrial									
Tb927.4.170	proteína hipotética									
Tb927.3.570	proteína del gene 2 asociado al sitio de expresión (ESAG2), putativa									
Tb927.3.3270	2.7.1.11 (6-fosfofructoquinas)	-1.1	-1.7		-1.3	-1.6				-1.9
Tb927.8.490	proteína hipotética									
Tb927.11.10060	6.3.4.15 (Botrina--[proteína transportadora de carboxilo de biotina] ligasa)									
Tb927.1.4970	proteína hipotética									
Tb927.7.2980	Familia de nitroreductasa, putativo									
Tb927.7.3020	Familia de nitroreductasa, putativo									
Tb927.7.180	Dominio transmembrana VSG que contiene proteína, putativo						-1.8			
Tb927.6.510	GHEET procielina									
Tb927.7.310	Prostaglandina H sintasa, putativa									
Tb927.6.530	proteína del gen 3 asociado a procielina (PAG3)									
Tb927.8.480	3.1.3.4 (Fosfatidato fosfatas)									-1.6
Tb927.7.170	proteína del gen 9 asociado al sitio de expresión (ESAG9), putativa						-1.4			-1.5
Tb927.8.510	proteína hipotética									-1.4
Tb927.3.590	Transportador de adenosina, putativo									
Tb927.11.1980	membro de la familia de proteínas con dedos de zinc, putativo									
Tb927.5.150	proteína hipotética, conservada									
Tb927.9.720	proteína hipotética, conservada									

Tabla 8. Valores de logFC correspondientes al análisis del transcriptoma tras el silenciamiento de otras proteínas. Solo se indican aquellos transcritos que muestran un $|\logFC| \geq 1.0$. Los conjuntos de datos de expresión diferencial se obtuvieron de las tablas

RESULTADOS

disponibles en las siguientes referencias: *RBPI0*, *CSD1*, *CSD2*, *AMPK* y *ZC3H45* (Toh et al., 2021); *DRBD18* (Mishra et al., 2021); *ZC3H22* (Erben et al., 2021); *ORC1* (Tiengwe et al., 2012); *NMD3* (Bühlmann et al., 2015).

4.6. El complejo ZC3H41/Z41AP se une a mRNAs que codifican proteínas ribosomales.

Habiendo demostrado que ZC3H41 y Z41AP son proteínas de unión a RNA genuinas, decidimos identificar el conjunto de mRNAs que se encuentran unidos al complejo ZC3H41/Z41AP. Para ello, se empleó el método de purificación por afinidad en tándem (TAP) seguido de secuenciación masiva (RIP-seq) utilizando Z41AP como cebo.

Todo el proceso de purificación de TAP-Z41AP, generación de librerías y secuenciación se realizó en paralelo a una RIP-seq de otro complejo de proteína de unión a RNA, PuREBP1/2, identificado en nuestro laboratorio (Rico-Jiménez et al., 2021). Por tanto, usamos este último TAP como control para identificar mRNAs asociados específicamente al complejo ZC3H41/Z41AP.

Los dos conjuntos de datos se analizaron utilizando edgeR o el identificador de picos MACS2 para identificar mRNAs enriquecidos en las fracciones purificadas con TAP. Ambos enfoques han sido utilizados con éxito en análisis de experimentos de RIP-seq (Rico-Jiménez et al., 2021; Fernández-Moya et al., 2014; Mugo et al., 2020; McIntyre et al., 2020). Sin embargo, las puntuaciones que se obtuvieron tras el análisis con MACS2 mostraron una mejor correlación con los datos de RT-PCR cuantitativa (obtenidos según describimos más adelante) que los valores de logFC proporcionados por edgeR (R de Pearson = 0,559 frente a 0,242, respectivamente) (Figura 16). Por lo tanto, a la vista de este análisis,

empleamos la herramienta MACS2 para evaluar la especificidad de nuestros resultados.

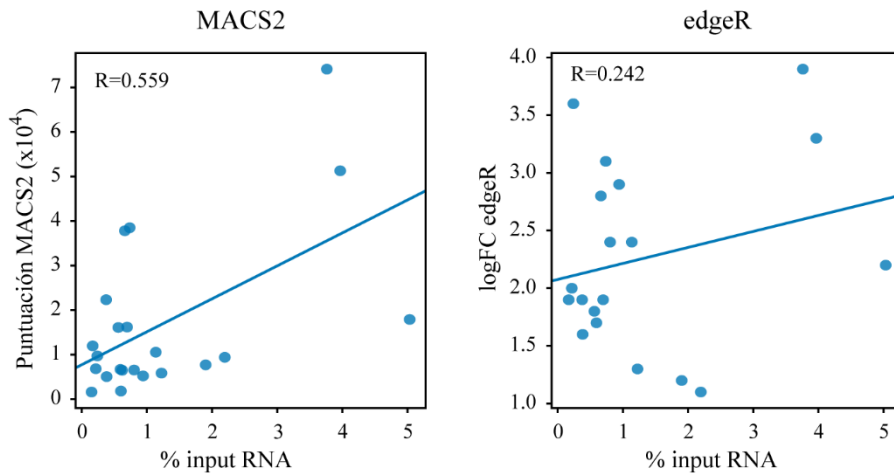


Figura 16. Análisis de correlación entre los porcentajes de mRNAs diana inmunoprecipitados y la puntuación de MACS2 o los valores de logFC de edgeR.

Los mRNAs *NT8* y *AATP6* son componentes conocidos del complejo PuREBP1/2 (Rico-Jiménez et al., 2021). Tras la purificación RIP de este complejo, las puntuaciones resultantes de los transcritos *NT8* y *AATP6* tras el análisis con MACS2 fueron >7000 (Figura 17A), por lo que establecimos este número como umbral para elegir transcritos unidos al complejo ZC3H41/Z41AP. El establecimiento de esta condición nos proporcionó una lista de 104 mRNAs, en la que destacaba una notable abundancia (69%) de transcritos que codifican proteínas ribosomales (Figura 17A y Anexo I). Además, 38 de los 40 transcritos con las puntuaciones más elevadas correspondían a mRNAs de proteínas ribosomales (Anexo I).

El análisis de la ontología génica de las proteínas codificadas por los mRNAs asociados al complejo ZC3H41/Z41AP reveló un claro

RESULTADOS

enriquecimiento en las categorías de 'biogénesis de ribosomas' y 'traducción' dentro de la ontología correspondiente a 'proceso biológico' (FDR < 0,0001), y en las categorías de 'constituyente estructural del ribosoma' y 'unión de rRNA' dentro de la ontología de función molecular (FDR < 0,0001).

Para confirmar la unión de los mRNAs diana al complejo ZC3H41/Z41AP, realizamos ensayos cuantitativos de RT-PCR después de la purificación RIP usando TAP-ZC3H41 o TAP-Z41AP como cebos. En paralelo, y como control negativo, purificamos los mRNAs asociados al complejo PuREBP1/2 usando PuREBP1-TAP como cebo. Observamos una alta correlación (R de Pearson = 0.968) entre los valores de enriquecimiento obtenidos por RT-PCR cuantitativa de TAP-ZC3H41 y TAP-Z41AP (Figura 17B), lo que respalda aún más la asociación de ambas proteínas dentro de la célula y fortalece la especificidad del ensayo.

Pudimos confirmar la asociación del complejo ZC3H41/Z41AP con transcritos que codifican las proteínas ribosomales *L4*, *L5*, *L7a*, *L14*, *L36*, *L37*, *L44*, *S8* y dos parálogos de *L38*, el factor de transcripción básico *BTF3*, la proteína de unión a RNA *NRBD2* (*p37*, que ha sido descrita como un constituyente del ribosoma), la proteína reguladora de la biogénesis ribosomal *RRS1*, las subunidades de la RNA polimerasa III *RPC4* y *RPC11*, y el factor de traducción *eIF1A* (Figura 17C, Figura 17D y Anexo I). El análisis estadístico mediante la prueba t de Student de dos colas, con un tamaño de muestra $n = 4$, demostró que todos estos transcritos se encontraban significativamente más enriquecidos ($P < 0.05$) en las purificaciones TAP-ZC3H41 o TAP-Z41AP que en la purificación PuREBP1-TAP (Figura 17C). Esto no se debió a una inmunoprecipitación ineficiente del complejo PuREBP1/2, ya que pudimos detectar un claro

enriquecimiento del transcrito *NT8* en la purificación PuREBP1-TAP pero no en las purificaciones TAP-ZC3H41 o TAP-Z41AP (Figura 17C).

El transcrito que codifica la trans-sialidasa (TS) no se encontró asociado significativamente con ZC3H41/Z41AP (Figura 17C), y tampoco se detectó en los análisis MACS2 o edgeR (Anexo I). Por lo tanto, el aumento en los niveles de mRNA de *TS* que observamos en células carentes de ZC3H41 probablemente se debe a efectos secundarios de la ribointerferencia que no tienen relación directa con el complejo ZC3H41/Z41AP.

RESULTADOS

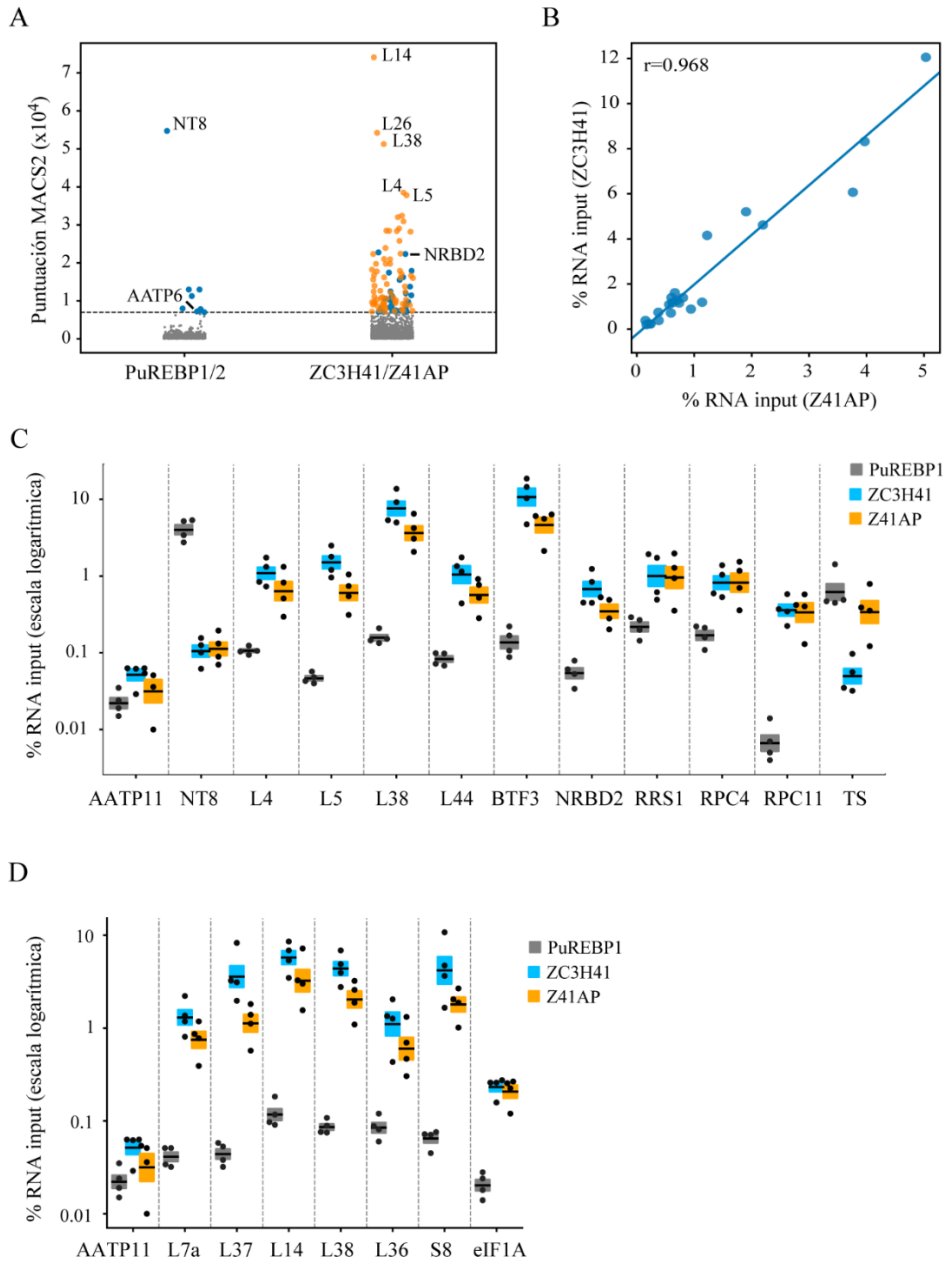


Figura 17. Identificación del conjunto de mRNAs unidos al complejo ZC3H41-Z41AP mediante RIP-seq. (A). Análisis MACS2 de los transcritos unidos a PuREBP1/2 y ZC3H41/Z41AP. Los transcritos inmunoprecipitados identificados por MACS2 se clasificaron según su puntuación. Se estableció un umbral de 7000 (línea discontinua horizontal) en función de las puntuaciones de los transcritos *NT8* y *AATP6*, que son

dianas del complejo PuREBP1/2. Los puntos azules corresponden a transcritos con una alta probabilidad de ser mRNAs unidos al complejo, los puntos grises corresponden a transcritos con una baja probabilidad estar unidos al complejo, y los puntos naranjas indican mRNAs que codifican proteínas ribosomales. **(B)**. Análisis de la correlación de los datos de RIP seguido de RT-PCR cuantitativa usando TAP-Z41AP o TAP-ZC3H41 como cebos. Los valores indican los porcentajes de los transcritos inmunoprecipitados en relación con el RNA input. **(C y D)**. RIP seguido de RT-PCR cuantitativa para confirmar la asociación de los transcritos con TAP-ZC3H41, TAP-Z41AP y PuREBP1-TAP (esta última usada como control negativo). Los transcritos *AATP11* y *NT8* se usaron en las purificaciones ZC3H41 y Z41AP como ejemplos de mRNAs que no se unen al complejo. Los datos de *L38* corresponden a los parálogos Tb927.9.2020 (C) y Tb927.10.3280 (D). Los porcentajes de RNA inmunoprecipitado respecto al RNA input se expresan como la media (líneas horizontales) \pm S.E.M. (áreas sombreadas) de cuatro RIP independientes (puntos).

Por último, evaluamos mediante ensayos de inmunotransferencia si la abundancia de algunas proteínas codificadas por transcritos unidos a ZC3H41/Z41AP se vio afectada en tripanosomas en los que la expresión ZC3H41 se había silenciado. Como se muestra en la Figura 18, ni los niveles de NRBD2 (p37) ni los de las proteínas ribosomales P0 o S9 (cuyos correspondientes transcritos también se asocian a ZC3H41/Z41AP, ver Anexo I), se vieron alterados después de 48 horas de inducción del RNAi.

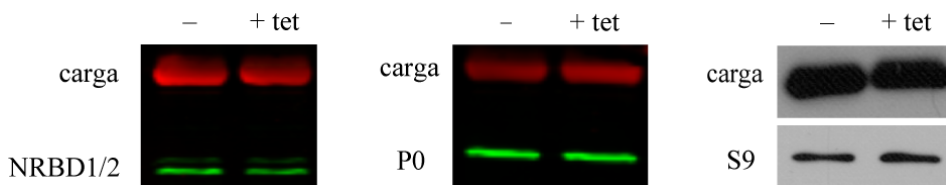


Figura 18. Efecto del silenciamiento de ZC3H41 sobre los niveles de las proteínas NRBD2 (p37), P0 y S9. Se usó α -tubulina como control de carga.

4.7. La asociación de ZC3H41/Z41AP con los mRNAs diana disminuye en condiciones estrés nutricional.

ZC3H41 y Z41AP se acumulan en gránulos de estrés tras una situación de estrés nutricional; sin embargo, los mRNAs que codifican proteínas ribosomales no forman parte de estas estructuras (Fritz et al., 2015). Dado que demostramos anteriormente que el complejo ZC3H41/Z41AP se une principalmente a transcritos que codifican componentes ribosomales en condiciones de crecimiento normales, nos planteamos evaluar si se producía una disminución en la asociación de ZC3H41/Z41AP y los mRNAs que codifican proteínas ribosomales en condiciones de estrés nutricional.

Para llevar a cabo dicho objetivo, las células que expresan TAP-ZC3H41 se sometieron a ayuno durante 3 horas, y analizamos la unión de los transcritos diana al complejo ZC3H41/Z41AP mediante RIP seguida de RT-PCR cuantitativa como se realizó anteriormente. Los resultados indicaron una disminución significativa en la unión de todos los mRNAs asociados a ZC3H41/Z41AP en condiciones de ayuno respecto a condiciones normales de cultivo (prueba t de Student de dos colas, $n = 4$, $P < 0.05$) (Figura 19A). Como control de mRNA no unido al complejo se utilizó el transcrito de *NT8*.

La pérdida de unión por ayuno no parece ser un efecto general debido al estrés, ya que se han descrito otras proteínas de unión a RNA que permanecen asociadas a sus transcritos diana en condiciones de estrés (Fernández-Moya et al., 2012) o son incluso más propensas a asociarse con sus mRNAs (Alves et al., 2014).

También evaluamos si la expresión de ZC3H41 o Z41AP estaba alterada en condiciones de estrés nutricional. Para ello, los tripanosomas que expresan ambas proteínas con una etiqueta diferente, 4xTy-ZC3H41 y TAP-Z41AP se sometieron a ayuno durante 3 horas y se cuantificaron los niveles de proteína por inmunotransferencia utilizando anticuerpos dirigidos contra las etiquetas. Como se muestra en la Figura 19B, los niveles totales de ZC3H41 y Z41AP no se alteraron cuando cultivamos los tripanosomas en PBS. Además, los niveles de proteína de ZC3H41 asociada a Z41AP se mantuvieron constantes tras el estrés nutricional.

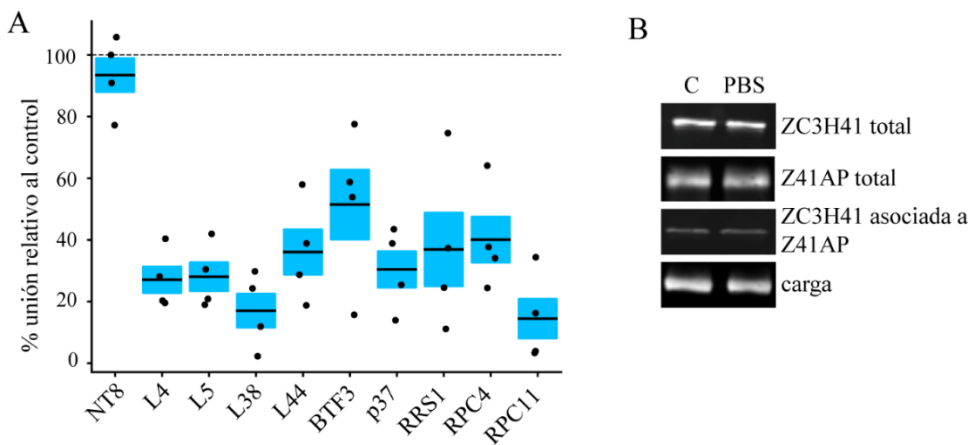


Figura 19. Asociación de ZC3H41/Z41AP con sus mRNAs diana en condiciones de estrés nutricional. (A). Las células que expresan TAP-ZC3H41 se incubaron en medio de cultivo normal o en PBS durante 3 horas, y la asociación con los transcritos indicados se evaluó mediante RIP seguida de RT-PCR cuantitativa. El transcrito *NT8* se utilizó como control negativo. Los porcentajes de RNA inmunoprecipitado en condiciones de estrés nutricional en relación con los medidos en condiciones normales se expresan como la media (líneas horizontales) \pm S.E.M. (áreas sombreadas) de cuatro RIP independientes (puntos). La línea discontinua horizontal indica un 100 % de unión en condiciones de ayuno respecto a condiciones normales de cultivo (es decir, ausencia de cambios en la unión a transcritos diana). Se usó una prueba t de Student de dos colas ($n = 4$) para evaluar la unión de los mRNAs asociados a ZC3H41/Z41AP en condiciones de estrés nutricional **(B)**. Los niveles de ZC3H41 y Z41AP no se alteran en condiciones de estrés

RESULTADOS

nutricional. La línea celular que expresaba tanto 4xTy-ZC3H41 como TAP-Z41AP se sometió a ayuno como se ha descrito anteriormente. Los niveles totales de ZC3H41 o Z41AP, así como los de ZC3H41 asociado con Z41AP tras la purificación de TAP, se evaluaron mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpos dirigidos contra las etiquetas. La α -tubulina fue usada como control de carga.

4.8. ZC3H41 y Z41AP están involucradas en la biogénesis del rRNA 5S.

Hemos demostrado que varios de los mRNAs asociados a ZC3H41/Z41AP codifican proteínas que desarrollan un papel fundamental en el proceso de maduración del rRNA 5S, concretamente NRBD2/p37 (Hellman et al., 2007a), la proteína reguladora de la biogénesis ribosomal RRS1 (Jaremko et al., 2019a) y las proteínas ribosomales L5 (Ciganda et al., 2012b) y L11 (Jaremko et al, 2019b) (Anexo I). Para investigar si ZC3H41 y/o Z41AP están involucradas en el proceso de maduración del rRNA 5S, medimos los niveles de rRNA 5S maduro y pre-5S mediante RT-PCR cuantitativa en tripanosomas donde la expresión de ZC3H41 o Z41AP se silenció durante 48 horas, y los comparamos con los de las células no inducidas.

Como se observa en la Figura 20A, pudimos detectar un aumento significativo de más de 3 veces en los niveles de pre-5S tras la eliminación de ZC3H41 o Z41AP, mientras que la cantidad de rRNA 5S maduro disminuyó significativamente alrededor de 1,7 veces en ambos casos.

Este efecto parece ser específico para el rRNA 5S, ya que los niveles de los otros rRNAs maduros que conforman la subunidad grande LSU y la subunidad pequeña SSU, así como el rRNA 5.8S, no cambiaron significativamente en ausencia de ZC3H41 o Z41AP (Figura 20A). Además, tampoco observamos cambios apreciables en los niveles totales

de rRNA 28S (LSUa y LSUb) y 18S (SSU) en las líneas de RNAi de ZC3H41 o Z41AP comparados con la línea parental mediante tinción con bromuro de etidio (Figura 20B). Estos resultados sugieren que ZC3H41 y Z41AP están involucrados en el proceso de maduración del rRNA 5S en *T. brucei*.

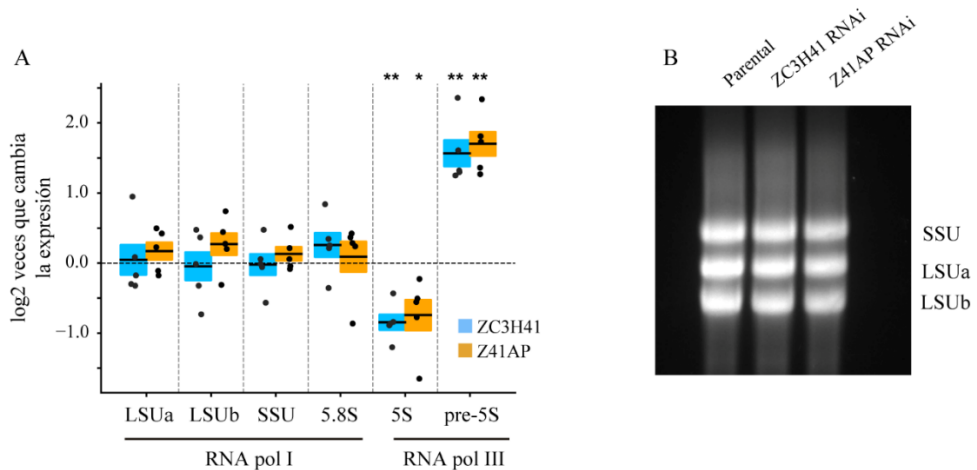


Figura 20. Efecto del silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP sobre los niveles de diferentes RNA ribosomales. (A). El RNA total se extrajo de células no inducidas y sin ZC3H41 o Z41AP, y los niveles de los rRNAs indicados (transcritos por RNA polimerasa I o III, según se indica) se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa. Los cambios de expresión (convertidos a log₂) en relación con las células no inducidas se expresan como la media (líneas continuas horizontales) ± S.E.M. (áreas sombreadas) de cinco inducciones independientes de RNAi (puntos). La línea discontinua horizontal indica log₂=0, es decir, no hay cambios en la expresión génica. Se usó una prueba t de Student de dos colas (n = 5) para evaluar si los niveles de rRNA se alteraron significativamente tras el silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP. *, P<0,05; **, P<0,005; las diferencias en los niveles de LSU, SSU y 5.8S no fueron significativas (P>0.19 en todos los casos). **(B).** Los niveles totales de rRNA SSU, LSUa y LSUb en la línea parental y en células sin ZC3H41 o Z41AP, se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes teñidos con bromuro de etidio.

4.9. El silenciamiento de la expresión de ZC3H41 o Z41AP produce una disminución global de la traducción.

El hecho de que el complejo ZC3H41/Z41AP se una a mRNAs que codifican proteínas ribosomales, y que la pérdida de su expresión parezca interferir con el procesamiento del rRNA 5S, nos llevó a evaluar si el silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP tenía algún efecto sobre la traducción de proteínas en el parásito. Con este fin, utilizamos el ensayo SUnSET, que se basa en la incorporación de puromicina a cadenas polipeptídicas nacientes y la posterior detección de los polipéptidos puromicilados mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-puromicina (Schmidt et al., 2009; Bakari-Soale et al., 2021).

Se observó una reducción en la intensidad de señal correspondiente a la puromicina incorporada tras el silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP en comparación con las células no inducidas (Figura 21A). La cuantificación de la señal detectada indicó una disminución significativa de 2 veces en la incorporación de puromicina (Figura 21B), lo que indica que la pérdida de ZC3H41/Z41AP conduce a una reducción global en la traducción. Como control positivo de la inhibición de la traducción se trató a los parásitos con cicloheximida, un conocido inhibidor de la síntesis proteica.

Como observamos anteriormente, la reducción de la expresión tanto de ZC3H41 como de Z41AP conlleva a una marcada reducción del crecimiento celular. Para evaluar si los cambios observados en traducción se debían simplemente a un efecto general producido por la ausencia de proliferación celular, realizamos en paralelo el mismo ensayo con la línea RNAi para la proteína de unión a RNA PuREBP1, que también es esencial

para el crecimiento celular del parásito (Rico-Jiménez et al., 2021). Como se puede observar en la Figura 21A y B, la traducción no se vio alterada significativamente al silenciar la expresión de PuREBP1, lo que nos indica que la disminución en la tasa de traducción que observamos en ausencia de ZC3H41 o Z41AP es específica.

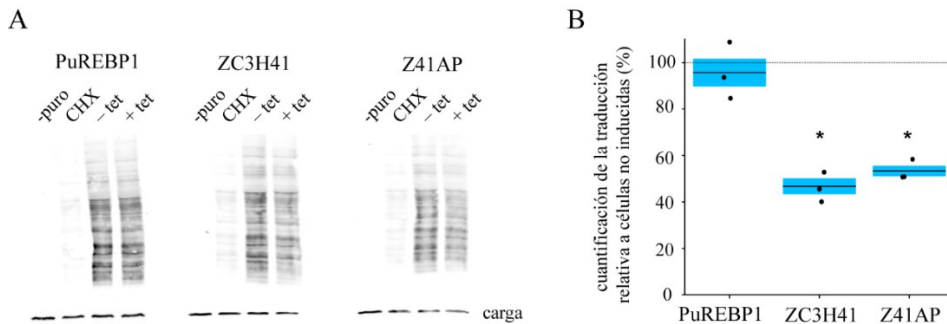


Figura 21. Efecto del silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP sobre la síntesis de proteínas. (A). Inmunotransferencia donde se muestra la incorporación de puromicina en polipéptidos nacientes. – puro, células no inducidas y no tratadas con puromicina; CHX, células no inducidas incubadas en presencia de cicloheximida 30 min antes del tratamiento con puromicina; – tet, células no inducidas tratadas con puromicina; + tet, células tratadas con puromicina después de 48 h de inducción del RNAi. Los polipéptidos puromicilados se detectaron usando un anticuerpo anti-puromicina. DRBD3 se utilizó como control de carga. **(B).** Cuantificación de la señal de puromicina en las inmunotransferencias. Los porcentajes de polipéptidos puromicilados tras el silenciamiento por RNAi en relación con los medidos en células no inducidas se expresan como la media (líneas horizontales) \pm S.E.M. (áreas sombreadas) de tres inducciones independientes de RNAi (puntos). La línea discontinua horizontal indica una señal de puromicina del 100 % en relación con las células no inducidas (es decir, ausencia de cambios en la traducción). Se usó una prueba t de Student de dos colas ($n = 3$) para evaluar si las tasas de traducción se alteraron significativamente tras el silenciamiento de PuREBP1, ZC3H41 o Z41AP. *, $P < 0,05$; las diferencias observadas tras el silenciamiento de PuREBP1 no fueron significativas ($P = 0,56$).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La organización del genoma de los tripanosomas es muy inusual; los genes se organizan en grandes unidades de transcripción policistrónica (*PTUs*) separadas por regiones de cambio de cadena divergentes (dSSR, *divergent Strand Switch Regions*) asociadas al inicio de la transcripción, o convergentes (cSSR, *convergent Strand Switch Regions*) relacionadas con el fin de la transcripción (Siegel et al., 2009). Estas *PTUs* son transcritas por la RNA polimerasa II y los transcritos primarios se procesan a mRNAs individuales mediante *trans-splicing* y poliadenilación. Es por ello que la regulación de la expresión génica en estos organismos ocurre casi exclusivamente a nivel postranscripcional (Clayton, 2019).

En este contexto, las proteínas de unión a RNA (RBPs) tienen un papel relevante al unirse generalmente a las regiones 3' no traducida de los mRNAs diana y reclutando a otros factores implicados en mecanismos de procesamiento, transporte, degradación o traducción, determinando así el destino del mRNA dentro de la célula (Romaniuk et al., 2016).

Dentro de las RBPs existe un grupo numeroso de proteínas que se definen por la presencia de un motivo de dedo de zinc de tipo CCCH que se une directamente al RNA. Se ha demostrado que algunas de estas proteínas están implicadas en la regulación de la diferenciación (Hendriks et al., 2001; Hendriks et al., 2005) y del ciclo celular (Bajak et al., 2020; Erben et al., 2021), la traducción de proteínas (Droll et al., 2013) y la expresión de antígenos de superficie (Walrad et al., 2012).

ZC3H41 es una proteína de dedo de zinc de tipo CCCH que ha sido identificada en *T. brucei* como una proteína presente en gránulos de estrés nutricional (Fritz et al., 2015). ZC3H41 también se asocia al SL

DISCUSIÓN

RNA, y junto con éste puede ser secretada en vesículas (Eliaz et al., 2017). Sin embargo, la función de esta proteína esencial es aún desconocida.

En esta tesis doctoral hemos demostrado que el silenciamiento de ZC3H41 en el parásito genera defectos graves del ciclo celular observando una fuerte detención del crecimiento acompañado de un aumento significativo en la proporción de células con defectos en el cariotipo. Concretamente, observamos una acumulación de células anucleadas con un solo kinetoplasto, denominadas zoides. Estos resultados sugieren que, en ausencia de ZC3H41, los tripanosomas procíclicos pueden sufrir citocinesis sin haber completado la mitosis. El fenotipo de zoide se observó originalmente cuando tripanosomas procíclicos fueron tratados con rizoxina, un fármaco que bloquea el ensamblaje de los microtúbulos del huso mitótico (Ploubidou et al., 1999), al sobreexpresar la proteína de dedos de zinc ZFP2 (Hendriks et al., 2001) o al inhibir la expresión de la ciclina mitótica CYC6 (Hammarton et al., 2003). Sin embargo, el incremento de la cantidad de células multinucleadas observado en ausencia de ZC3H41 demuestra que también existen tripanosomas procíclicos que pueden progresar normalmente a través de la mitosis, pero luego no son capaces de llevar a cabo la citocinesis.

El silenciamiento de la expresión de ZC3H41 también condujo a la aparición de células con un alargamiento aberrante del extremo posterior. Esta reestructuración morfológica es compatible con el 'fenotipo *nozzle*' observado por primera vez en tripanosomas procíclicos que expresan de forma ectópica la proteína de dedo de zinc ZFP2. Este fenotipo implica la extensión polar de los microtúbulos del citoesqueleto en el extremo posterior de la célula, similar a los eventos morfogénicos que sufre el parásito durante el proceso de diferenciación (Hendriks et al., 2001). La

inducción del RNAi de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, como la ciclina Cyc-2 (Hammarton et al., 2004), la proteína de unión a RNA RRM1 (Níttolo et al., 2018) y las proteínas ALBA 3/4 (Subota et al., 2011) ha demostrado producir también este fenotipo *nozzle* en *T. brucei*.

ZC3H41 forma un heterodímero estable con una proteína a la que hemos llamado en este trabajo Z41AP. Ambas proteínas son capaces de unirse al RNA *in vivo*, a juzgar por los experimentos de irradiación con luz ultravioleta y marcaje del fosfato gamma del ATP con ³²P radiactivo.

Z41AP también resultó ser una proteína esencial para la proliferación en tripanosomas procíclicos. El estudio realizado a partir de los datos de la abundancia diferencial de proteínas entre la forma sanguínea y procíclica del parásito (Tinti et al., 2022; Ferguson et al., 2022) nos indicó que ambas proteínas se encuentran aproximadamente en los mismos niveles dentro de la célula. Sin embargo, ZC3H41 y Z41AP son aparentemente estables en ausencia de la otra, lo que indica que además de encontrarse formando un complejo, ZC3H41 y Z41AP también podrían estar presentes como entidades independientes. De hecho, esto podría ser así ya que cuando se inhibió la expresión de Z41AP, el ciclo y la morfología celular se vieron poco afectados, lo que indica que ZC3H41 podría tener funciones adicionales y específicas dentro del complejo o estas diferencias podrían deberse simplemente a una menor eficiencia del RNAi de Z41AP.

Hemos observado que el heterodímero ZC3H41/Z41AP también se asocia a las proteínas de unión a poli(A), PABP1 y PABP2, y al factor de inicio de la traducción eIF4E4. Se ha demostrado que PABP1 y PABP2 forman dos complejos proteicos distintos en *T. brucei*, y que ZC3H41,

DISCUSIÓN

Z41AP y eIF4E4 se encuentran asociados predominantemente al complejo PABP1 (Zoltner et al., 2018) junto con la proteína de unión a RNA RBP23 y el factor de inicio de la traducción eIF4G3 (Bezerra et al., 2022). Estas mismas asociaciones se han observado en el parásito relacionado *Leishmania infantum* (Assis et al., 2021). Nuestros datos muestran que PABP1, PABP2 y eIF4E4 se encuentran asociados al complejo ZC3H41/Z41AP en cantidades subestequiométricas y esta unión es dependiente de RNA, ya que el tratamiento con RNasas condujo a una pérdida de interacción. Aunque ZC3H41 y Z41AP parecen asociarse con las proteínas PABPs (principalmente con PABP1), es probable que el heterodímero ZC3H41/Z41AP también exista como una entidad independiente. Estos resultados están respaldados por la observación de que ZC3H41 y Z41AP son mucho más abundantes que PABP1, y también se encuentran en exceso en relación a eIF4E4 (Figura 12A).

También se detectaron proteínas ribosomales unidas al complejo ZC3H41/Z41AP. Aunque las proteínas ribosomales aparecen comúnmente en purificaciones de otras proteínas de unión a RNA (Ouna et al., 2012) y pueden ser consideradas contaminantes, pensamos que, en nuestro caso no podemos descartar una asociación específica. Esto es debido a que, al comparar el patrón de la purificación de TAP sola con la purificación de ZC3H41, no se observaron proteínas ribosomales. Además, el hecho de que ZC3H41 se haya encontrado asociada a polisomas en *T. brucei* (Klein et al., 2015) apoya también la unión específica de ZC3H41 a ribosomas.

El silenciamiento de ZC3H41 condujo a cambios mínimos en el transcriptoma, lo que sugiere que el papel principal de esta proteína no está relacionado con el recambio de mRNAs. El transcrito que codifica la trans-sialidasa Tb927.11.11410 se vio enriquecido al menos 8 veces en

células sin ZC3H41 comparado con las células control. Sin embargo, este mRNA no se encontró asociado significativamente con ZC3H41/Z41AP, por lo que el aumento en la abundancia del mRNA de la trans-sialidasa en células sin ZC3H41 probablemente se deba a efectos secundarios no relacionados directamente con ZC3H41.

La secuenciación de los transcritos asociados a ZC3H41/Z41AP ha demostrado que el complejo se asocia preferentemente a mRNAs que codifican proteínas ribosomales. Los complejos implicados en la traducción en tripanosomátidos son aquellos formados por las subunidades eIF4E3/eIF4G4 y eIF4E4/eIF4G3 (Freire et al., 2017), cuyas diferencias funcionales aún no se han descrito completamente; una posibilidad sería que los diferentes complejos se asocien con distintos subconjuntos de mRNAs. Se ha demostrado que aproximadamente el 40% de los transcritos unidos a eIF4E4 codifican proteínas ribosomales, mientras que estos constituyen menos del 4% de los transcritos unidos a eIF4E3 en *T. brucei* (Bezerra et al., 2022). Además, estudios similares realizados en *Leishmania* muestran que los mRNAs que codifican proteínas ribosomales se encuentran unidos a RBP23 y PABP1, junto con el complejo eIF4E4/eIF4G3 (Assis et al., 2021). Esto concuerda con nuestras observaciones, ya que ZC3H41 copurifica con PABP1 y con el factor de inicio de la traducción eIF4E4.

El silenciamiento de ZC3H41 no alteró los niveles de las proteínas correspondientes a alguno de los mRNAs asociados a ZC3H41/Z41AP como son las proteínas ribosomales S9, P0 y p37/NRBD2, lo que sugiere que ZC3H41 tampoco regula la traducción de los transcritos a los que se une. De acuerdo con esto, la búsqueda global de nuevos reguladores postranscripcionales en *T. brucei*, mostró que la unión de ZC3H41 o

DISCUSIÓN

Z41AP a un gen reportero no provocó cambios en la expresión del mismo (Erben et al., 2014).

Las RBPs no se unen aleatoriamente a mRNAs individuales, sino que se asocian a elementos que actúan en *cis* dentro de las regiones 3'-UTR de mRNAs relacionados funcionalmente regulando su expresión de manera coordinada como regulones postranscripcionales (Fernández-Moya et al., 2010). Los mRNAs que codifican proteínas ribosomales generalmente son muy abundantes, pero requieren un control estricto de su traducción. En mamíferos se caracterizan por la presencia de una secuencia de pirimidinas en sus extremos 5'-UTR, y su traducción está regulada a través de la proteína de unión al RNA LARP (Fonseca et al., 2018). En tripanosomátidos, la presencia del *spliced leader* en la región 5'-UTR común a todos los mRNAs descarta un modo de reconocimiento similar al de los mamíferos. Además, una característica notable de los mRNAs que codifican proteínas ribosomales en tripanosomátidos es su pequeña región codificante y sus cortas regiones no traducidas tanto 5' como 3' (Jensen et al., 2014).

Ambas PABPs son proteínas abundantes que se expresan simultáneamente y se unen a distintos subconjuntos de mRNAs. Concretamente, PABP1 de *Leishmania* y *T. brucei* se asocia a mRNAs que codifican proteínas ribosomales mientras que PABP2 probablemente regula la traducción de la mayoría de los mRNA ya que interactúa con una amplia gama de proteínas e ingresa en gránulos de estrés. Aunque todavía no hay una explicación clara para esta selección diferencial de mRNAs, es probable que esté mediada por RBPs que interactúan con las PABPs y con los mRNAs diana, y por tanto ZC3H41/Z41AP podrían estar jugando un papel importante a este nivel. Los resultados presentados en esta tesis

indican que el papel principal del complejo ZC3H41/Z41AP no parece estar relacionado con el recambio de mRNAs ni con la regulación de la abundancia de proteínas ribosomales. En el conjunto de proteínas asociadas a ZC3H41 en la purificación TAP, detectamos la proteína NTF2-like (Tb927.10.2240). Esta proteína forma parte del complejo de exportación nuclear de los mRNAs (Bercovich et al., 2009). Aquí, proponemos un modelo en el que el complejo ZC3H41/Z41AP se une a motivos presentes en los mRNAs que codifican proteínas ribosomales y podría participar en el transporte de estos mRNAs al citoplasma de la célula, facilitando o fortaleciendo además la interacción de estos mRNAs con el complejo PABP1/eIF4E4/eIF4G3 para su traducción (Figura 22).

En eucariotas, las proteínas ribosomales producidas en exceso que no logran ensamblarse en los ribosomas, se conjugan con ubiquitina y son degradadas por el proteasoma, lo que sugiere que la coordinación adecuada de la síntesis y el ensamblaje es fundamental (Sung et al., 2016). Z41AP contiene un motivo SKP1. Este motivo se encuentra presente en uno de los componentes que forman el complejo proteico ubiquitina ligasa (McKean, 2003). Las proteínas con una combinación de dominios asociados a ubiquitinación y a unión al RNA son comunes en muchas especies; los tripanosomas no son una excepción. Entre las proteínas CCCH de kinetoplastidos hay varias con una conexión con la vía de la ubiquitinación. Por ejemplo, ZFP2 y ZFP3 de *T. brucei* tienen un motivo homólogo a un motivo de las ligasas HECT tipo E3 de la familia Nedd4. Por lo tanto, Z41AP podría actuar como una vía de control de calidad marcando los mRNAs que codifican proteínas ribosomales como objetivos para ser degradados por el proteasoma.

DISCUSIÓN

En condiciones de estrés nutricional, los polisomas se disocian y la mayoría de los mRNAs, algunos factores de inicio de la traducción y PABP2 se translocan de forma reversible a gránulos de estrés nutricional; sin embargo, PABP1 y algunas proteínas asociadas se excluyen en gran medida de estas estructuras. A diferencia de otros eucariotas, en *T. brucei* es llamativo que los mRNAs que codifican las proteínas ribosomales se encuentren ausentes en gránulos de estrés (Fritz et al., 2015). En esta tesis doctoral hemos demostrado que los transcritos que codifican proteínas ribosomales se encuentran significativamente menos asociados al complejo ZC3H41/Z41AP cuando el parásito es sometido a estrés nutricional. Ya que ZC3H41 y Z41AP han sido descritas como componentes de los gránulos de estrés, podríamos pensar que los complejos de ribonucleoproteína de ZC3H41/Z41AP se reestructuran en respuesta a cambios ambientales. En este sentido, se ha demostrado que ZC3H41 se acumula en vesículas que se secretan y que parece que transmiten señales de estrés para la comunicación entre parásitos (Eliaz et al., 2017). Por otra parte, se ha sugerido que la fosforilación puede inducir cambios conformacionales en una RBP, ya sea promoviendo o inhibiendo interacciones proteína-proteína o proteína-RNA, lo que podría tener un enorme impacto en la regulación de la expresión génica en los tripanosomas (Urbaniak et al. 2013). Un análisis fosfoproteómico global basado en espectrometría de masas ha revelado que ZC3H41 se fosforila en respuesta a estrés por choque térmico (Ooi et al., 2020). Por lo tanto, también es posible que ZC3H41 y/o Z41AP también se fosforilen en respuesta a estrés nutricional, dando como resultado un cambio en la unión a los mRNAs que codifican proteínas ribosomales según la disponibilidad de nutrientes. También se ha visto que la ubiquitinación puede desempeñar un papel importante en la regulación de la estabilidad o

localización de las proteínas de unión al RNA. Como se ha comentado anteriormente, Z41AP contiene un motivo en estrecha asociación con motivos de ubiquitina. Es posible que la ubiquitinación sea un mecanismo para cambiar rápidamente la estabilidad o la localización intracelular de las proteínas CCCH en respuesta a señales ambientales (Kramer et al., 2013).

La presencia de mRNAs unidos a ZC3H41/Z41AP que codifican factores involucrados en la biogénesis del rRNA 5S nos llevó a investigar si el silenciamiento de ZC3H41 o Z41AP tenía algún efecto en la maduración del rRNA 5S. El silenciamiento de ZC3H41 provocó una acumulación de precursores del rRNA 5S y una reducción en la traducción global en el parásito. El rRNA 5S se transcribe por la RNA polimerasa III, mientras que todos los demás rRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa I. En este sentido resulta llamativo que dos componentes del complejo RNA polimerasa III, RPC4 y RPC11, se encuentran unidos al complejo ZC3H41/Z41AP. Además de su dominio de dedo de zinc, ZC3H41 posee en el extremo C-terminal un dominio homólogo a helicasas de RNA de las superfamilias 1 y 2. En su mayoría, las helicasas de RNA pertenecientes a estas superfamilias se localizan en el nucleolo y participan en la biogénesis de los ribosomas (Rajan et al., 2019). ZC3H41 se localiza principalmente en el citoplasma; sin embargo, una fracción parece localizarse dentro del nucleolo (<http://www.tryptag.org/>). Por ello, además de tener un papel en la regulación del destino de los mRNAs que codifican proteínas ribosomales, resulta atractivo pensar que ZC3H41 podría estar involucrado en el transporte del precursor del rRNA 5S al nucleolo.

DISCUSIÓN

Ambos tipos de RNA (mRNAs que codifican proteínas ribosomales y rRNA 5S) son muy abundantes dentro de la célula. Por lo tanto, se esperaría que los niveles de ZC3H41 y Z41AP también fueran elevados. En efecto, ambas proteínas se encuentran entre el 5 % de las proteínas más abundantes en los tripanosomas procíclicos, y también son claramente las más abundantes en comparación con todas las proteínas con dedos de zinc tipo CCCH en *T. brucei* (Figura 12B).

Dado que los mRNAs que codifican proteínas ribosomales están específicamente enriquecidos en el transcriptoma unido a ZC3H41/Z41AP, y este complejo también está involucrado en el procesamiento de rRNA 5S, resulta tentador especular que ZC3H41 y Z41AP están implicadas en el control del destino de la maquinaria de traducción en respuesta a cambios ambientales. En este sentido, hemos demostrado que la pérdida de ZC3H41 o Z41AP conduce a una reducción de la traducción.

Además, ZC3H41/Z41AP podría desempeñar funciones importantes en otras etapas del ciclo de vida de *T. brucei*. Estudios proteómicos han revelado que los niveles de las proteínas ZC3H41 y Z41AP son 2,4 y 2,2 veces menos abundantes, respectivamente, en los tripanosomas metacíclicos en comparación con los niveles en las formas procíclicas de *T. brucei* (Christiano et al., 2017). Se sabe que dentro de la mosca *tse-tse*, la diferenciación de la forma procíclica a la forma metacíclica conlleva un alargamiento de los microtúbulos en el extremo posterior de la célula. En este sentido, hemos observado que en ausencia de ZC3H41 los tripanosomas procíclicos presentan un fenotipo *nozzle* que corresponde a este cambio morfológico que experimenta el parásito durante el proceso de diferenciación. Además, los tripanosomas

metacíclicos de *T. brucei* y *T. cruzi* son formas infecciosas no proliferativas en las que la eficiencia de traducción de los componentes ribosómicos disminuye, mientras que la traducción de factores de virulencia como la trans-sialidasa aumenta en los tripanosomas metacíclicos de *T. cruzi* (Smircich et al., 2015; Christiano et al., 2017). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que tras el silenciamiento de la expresión de ZC3H41 observamos una disminución global de la traducción a la vez que el mRNA que codifica una trans-sialidasa se encontró claramente regulado positivamente. Por lo tanto, en conjunto todos estos datos sugieren que ZC3H41 podría ser importante durante la diferenciación a células metacíclicas quiescentes.

En resumen, los resultados de esta tesis doctoral muestran que, según los requerimientos nutricionales del parásito, el complejo ZC3H41/Z41AP podría participar en el transporte selectivo de mRNAs que codifican proteínas ribosomales dentro de la célula facilitando además su asociación con el complejo PABP1/eIF4E4/eIF4G3 para su traducción. Nuestro trabajo proporciona una vía interesante para explorar más a fondo cómo los tripanosomas vinculan la detección de señales nutricionales con la regulación de la expresión génica.

DISCUSIÓN

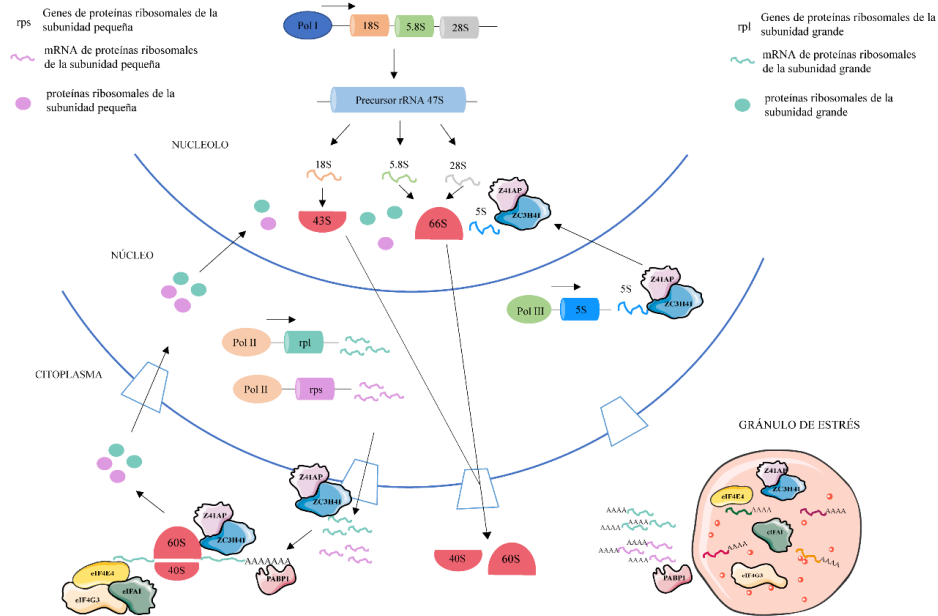


Figura 22. Modelo propuesto como mecanismo de acción de ZC3H41/Z41AP. En condiciones normales, el complejo ZC3H41/Z41AP podría participar en el transporte hacia el citoplasma de la célula de mRNAs que codifican proteínas ribosomales facilitando además su asociación con el complejo PABP1/eIF4E4/eIF4G3 para su traducción, así como en el transporte del precursor del rRNA 5S al nucleolo. En condiciones de estrés nutricional la mayoría de los mRNAs, el complejo de inicio de la traducción eIF4E4/eIF4G3/eIFAI y complejo ZC3H41/Z41AP se translocan a gránulos de estrés, mientras que los mRNAs que codifican las proteínas ribosomales se excluyen de estas estructuras.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. ZC3H41 es una proteína esencial en la forma procíclica de *T. brucei*. El silenciamiento de su expresión por ribointerferencia afecta de manera acusada a la proliferación del parásito y a la progresión del ciclo celular.
2. ZC3H41 forma un complejo estable con una proteína de unión a RNA de función desconocida, Z41AP. Otros miembros que forman parte del complejo incluyen las proteínas de unión a poli(A), PABP1 y PABP2 y el factor de inicio de la traducción eIF4E4.
3. ZC3H41 y Z41AP se unen a RNA *in vivo*.
4. El silenciamiento de ZC3H41 ocasiona cambios mínimos en el transcriptoma de *T. brucei*, lo que indica que el papel principal de esta proteína no parece estar relacionado con el recambio de mRNAs.
5. El complejo ZC3H41/Z41AP se asocia a un conjunto específico de mRNAs que codifican proteínas ribosomales, proteínas reguladoras de la biogénesis de ribosomas y subunidades de la RNA polimerasa III.
6. La unión a estos transcritos se altera en condiciones de estrés nutricional, lo que indica que el complejo ribonucleoproteico que forma ZC3H41 se remodela en respuesta a señales ambientales.
7. El silenciamiento tanto de ZC3H41 como de Z41AP provoca defectos en el procesamiento del rRNA 5S y conduce a una disminución de la traducción global.

CONCLUSIONES

8. Nuestros resultados indican que, según los requerimientos nutricionales del parásito, el complejo formado por ZC3H41/Z41AP podría participar en el transporte selectivo de mRNAs que codifican proteínas ribosomales dentro de la célula, facilitando además su asociación con el complejo PABP1/eIF4E4/eIF4G3.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alves, L. R., Oliveira C., Mörking, P. A., Kessler, R. L., Martins, S. T., Romagnoli, B. A., Marchini, F. K., Goldenberg, S. (2014). The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. *RNA Biol*, 11(7):921-33. <https://doi.org/10.4161/rna.29622>.

Ammar, Z., Plazolles, N., Baltz, T., Coustou, V. (2013). Identification of trans-sialidases as a common mediator of endothelial cell activation by African trypanosomes. *PLoS Pathog*, 9(10):e1003710. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003710>.

Archer, S. K., Inchaustegui, D., Queiroz, R., Clayton, C. (2011). The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*, 6(3):e18425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018425>.

Archer, S., Luu, V., de Queiroz, R., Brems, S., Clayton, C. (2009). *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. *PLoS Pathog*, 5(8):e1000565. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000565>.

Assis, L. A., Santos Filho, M. V. C., da Cruz Silva, J. R., Bezerra, M. J. R., de Aquino, I. R. P. U. C., Merlo, K. C, Holetz, F. B., Probst, C. M., Rezende, A. M., Papadopoulou, B., da Costa Lima, T. D. C., de Melo Neto, O. P. (2021). Identification of novel proteins and mRNAs differentially bound to the *Leishmania* Poly(A) Binding Proteins reveals a direct association between PABP1, the RNA-binding protein RBP23 and mRNAs encoding ribosomal proteins. *PLoS Negl Trop Dis*, 15(10):e0009899. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009899>.

BIBLIOGRAFÍA

Bajak, K., Leiss, K., Clayton, C., Erben, E. (2020). A potential role for a novel ZC3H5 complex in regulating mRNA translation in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, 295(42):14291-14304. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014346>.

Bakari-Soale, M., Ikenga, N. J., Scheibe, M., Butter, F., Jones, N.G., Kramer, S., Engstler, M. (2021). The nucleolar DExD/H protein Hel66 is involved in ribosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep*, 11(1):18325. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97020-0>.

Balagopal, V., Parker, R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 21(3):403-8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.005>.

Bangs, J. D., Crain, P. F., Hashizume, T., McCloskey, J. A., Boothroyd, J. C. (1992). Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem*, 267(14):9805-15. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50165-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50165-X).

Barrett, M. P. (2018). The elimination of human African trypanosomiasis is in sight: Report from the third WHO stakeholders meeting on elimination of gambiense human African trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(12):e0006925. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006925>.

Bastin, P., Bagherzadeh, Z., Matthews, K. R., Gull, K. (1996). A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 77(2):235-9. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02598-4](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02598-4).

Beckmann, B. M., Horos, R., Fischer, B., Castello, A., Eichelbaum, K., Alleaume, A. M., Schwarzl, T., Curk, T., Foehr, S., Huber, W., Krijgsveld, J., Hentze, M. W. (2015). The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat Commun*, 6:10127. <https://doi.org/10.1038/ncomms10127>.

Benz, C., Nilsson, D., Andersson, B., Clayton, C., Guilbride, D. L. (2005). Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 143(2):125-34. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.05.008>.

Bercovich, N, Levin, M. J., Clayton, C., Vazquez, M. P. (2009). Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 166(2):190-3. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.03.008>.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., ... El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733):416-22. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>.

Bezerra, M. J. R., Moura, D. M. N., Freire, E. R., Holetz, F. B., Reis, C. R. S., Monteiro, T. T.S., Pinto, A. R. S., Zhang, N., Rezende, A. M., Pereira-Neves, A., Figueiredo, R. C. B. Q., Clayton, C., Field, M. C., Carrington, M., de Melo Neto, O. P. (2022). Distinct mRNA and protein interactomes highlight functional differentiation of major eIF4F-like complexes from *Trypanosoma brucei*. *Front Mol Biosci*, 7:971811. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.971811>.

BIBLIOGRAFÍA

Biebinger, S., Rettenmaier, S., Flaspohler, J., Hartmann, C., Peña-Díaz, J., Wirtz, L. E., Hotz, H. R., Barry, J. D., Clayton, C. (1996). The PARP promoter of *Trypanosoma brucei* is developmentally regulated in a chromosomal context. *Nucleic Acids Res*, 24(7):1202-11. <https://doi.org/10.1093/nar/24.7.1202>.

Biebinger, S., Wirtz, L. E., Lorenz, P., Clayton, C. (1997). Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 85(1):99-112. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(96\)02815-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02815-0).

Bishola Tshitenge, T., Clayton, C. (2022). Interactions of the *Trypanosoma brucei brucei* zinc-finger-domain protein ZC3H28. *Parasitology*, 149(3):356-370. <https://doi.org/10.1017/S003118202100189X>.

Boehm, V., Gehring, N. H., Clayton, C., Vazquez, M. P. (2016). Exon junction complexes: supervising the gene expression assembly line. *Trends Genet*, 32, 724–735. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.003>.

Bühlmann, M., Walrad, P., Rico, E., Ivens, A., Capewell, P., Naguleswaran, A., Roditi, I., Matthews, K. R. (2015). NMD3 regulates both mRNA and rRNA nuclear export in African trypanosomes via an XPO1-linked pathway. *Nucleic Acids Res*, 43(9):4491-504. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv330>.

Burkard, G., Fragoso, C. M., Roditi, I. (2007). Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 153(2):220-3. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.02.008>.

- Campbell, D. A., Kubo, K., Clark, C. G., Boothroyd, J. C. (1987). Precise identification of cleavage sites involved in the unusual processing of trypanosome ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, 196(1):113-24. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90514-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90514-6).
- Cassola, A., De Gaudenzi, J., Frasch, A. (2007). Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol.*, 65(3):655-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05833.x>.
- Cesaro, G., Carneiro, F. R. G., Ávila, A. R., Zanchin, N. I. T., Guimarães, B. G. (2019). Trypanosoma brucei RRP44 is involved in an early stage of large ribosomal subunit RNA maturation. *RNA Biol.*, 16(1):133-143. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1564463>.
- Chakraborty, C., Clayton, C. (2018) Stress susceptibility in Trypanosoma brucei lacking the RNA-binding protein ZC3H30. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(10):e0006835. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006835>.
- Chikne, V., Shanmugha Rajan, K., Shalev-Benami, M., Decker, K., Cohen-Chalamish, S., Madmoni, H., Biswas, V.K., Kumar Gupta, S., Doniger, T., Unger, R., Tschudi, C., Ullu, E., Michaeli, S. (2019). Small nucleolar RNAs controlling rRNA processing in Trypanosoma brucei. *Nucleic Acids Res.*, 47(5):2609-2629. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1287>.
- Christiano R, Kolev NG, Shi H, Ullu E, Walther TC, Tschudi C. (2017). The proteome and transcriptome of the infectious metacyclic form of Trypanosoma brucei define quiescent cells primed for mammalian invasion. *Mol Microbiol.*, 106(1):74-92. <https://doi.org/10.1111/mmi.13754>.

BIBLIOGRAFÍA

Ciganda, M., Prohaska, K., Hellman, K., Williams, N. (2012b). A novel association between two trypanosome-specific factors and the conserved L5–5S rRNA complex. *PLoS One*, 7(7):e41398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041398>.

Ciganda, M., Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2(4):523-33. <https://doi.org/10.1002/wrna.74>.

Ciganda, M., Williams, N. (2012a). Characterization of a novel association between two trypanosome-specific proteins and 5S rRNA. *PLoS One*, 7(1):e30029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030029>.

Clayton, C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol*, 9(6):190072. <https://doi.org/10.1098/rsob.190072>.

Clayton, C. E., Estévez, A. M., Hartmann, C., Alibu, V. P., Field, M., Horn, D. (2005). Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol*, 309:39–60. <https://doi.org/10.1385/1-59259-935-4:039>.

Cordon-Obras, C., Gomez-Liñan, C., Torres-Rusillo, S., Vidal-Cobo, I., Lopez-Farfan, D., Barroso-Del Jesus, A., Rojas-Barros, D., Carrington, M., Navarro, M. (2022). Identification of sequence-specific promoters driving polycistronic transcription initiation by RNA polymerase II in trypanosomes. *Cell Rep*, 38(2):110221. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110221>.

Cristodero, M., Clayton, C. E. (2007). Trypanosome MTR4 is involved in rRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 35(20):7023-30. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm736>.

- Cross, G. A., Kim, H. S., Wickstead, B. (2014). Capturing the variant surface glycoprotein repertoire (the VSGnome) of *Trypanosoma brucei* Lister 427. *Mol Biochem Parasitol*, 195:59–73. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.004>.
- D'Orso, I., De Gaudenzi, J. G., Frasch, A. C. (2003). RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends Parasitol*, 19(4):151-5. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00035-7](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00035-7).
- D'Orso, I., De Gaudenzi, J. G., Frasch, A. C. (2003). RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends Parasitol*, 19(4):151-5. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00035-7](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00035-7).
- Dickie, E. A., Giordani, F., Gould, M. K., Mäser, P., Burri, C., Mottram, J. C., Rao, S. P. S., Barrett, M. P. (2020). New Drugs for Human African Trypanosomiasis: A Twenty First Century Success Story. *Trop Med Infect Dis*, 5(1):29. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5010029>.
- Dostalova, A., Käser, S., Cristodero, M., Schimanski, B. (2013). The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. *Mol Microbiol*, 88(4):728-39. <https://doi.org/10.1111/mmi.12217>.
- Droll, D., Archer, S., Fenn, K., Delhi, P., Matthews, K., Clayton C. (2010). The trypanosome Pumilio-domain protein PUF7 associates with a nuclear cyclophilin and is involved in ribosomal RNA maturation. *FEBS Lett*, 584(6):1156-62. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.018>.

BIBLIOGRAFÍA

Droll, D., Minia, I., Fadda, A., Singh, A., Stewart, M., Queiroz, R., Clayton, C. (2013). Post-transcriptional regulation of the trypanosome heat shock response by a zinc finger protein. *PLoS Pathog*, 9(4):e1003286. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003286>.

Eliasz, D., Kannan, S., Shaked, H., Arvatz, G., Tkacz, I. D., Binder, L., Waldman Ben-Asher, H., Okalang, U., Chikne, V., Cohen-Chalamish, S., Michaeli, S. (2017). Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*, 13(3):e1006245. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006245>.

Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grunfelder, C. G., Schwarz, H., Boshart, M., Overath P. (2004). Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 17:1105–1115. <https://doi.org/10.1242/jcs.00938>.

Erben, E., Fadda, A., Lueong, S., Hoheisel, J., Clayton, C. (2014). Genome-wide discovery of post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*, 10(6):e1004178. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004178>.

Erben, E., Leiss, K., Liu, B., Gil, D. I., Helbig, C., Clayton, C. (2021). Insights into the functions and RNA binding of *Trypanosoma brucei* ZC3H22, RBP9 and DRBD7. *Parasitology*, 148(10):1186-1195. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000123>.

Estévez, A. M. (2008). The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, 36(14):4573-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn406>.

Estévez, A. M., Kempf, T., Clayton, C. (2001). The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*, 20:3831–3839. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3831>.

Fadda, A., Färber, V., Droll, D., Clayton, C. (2013). The roles of 3'-exoribonucleases and the exosome in trypanosome mRNA degradation. *RNA*, 19(7):937-47. <https://doi.org/10.1261/rna.038430.113>.

Fantoni, A., Dare, A. O., Tschudi, C. (1994). RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Mol Cell Biol*, 14(3):2021-8. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.2021-2028.1994>.

Ferguson, M. A. J., Tinti, M. (2022) Visualisation of proteome-wide ordered protein abundances in *Trypanosoma brucei*. *Wellcome Open Res* 7:34 <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17607.1>

Fernández-Moya, S. M., Carrington, M., Estévez, A. M. (2014). A short RNA stem-loop is necessary and sufficient for repression of gene expression during early logarithmic phase in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, 42(11):7201-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gku358>.

Fernández-Moya, S. M., Carrington, M., Estévez, A. M. (2014). Depletion of the RNA-Binding protein RBP33 results in increased expression of silenced RNA polymerase II transcripts in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*, 9(9):e107608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107608>.

Fernández-Moya, S. M., Estévez, A. M. (2010). Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 1(1):34-46. <https://doi.org/10.1002/wrna.6>.

BIBLIOGRAFÍA

Fernández-Moya, S. M., García-Pérez, A., Kramer, S., Carrington, M., Estévez, A. M. (2012). Alterations in DRBD3 ribonucleoprotein complexes in response to stress in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*, 7:e48870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048870>.

Fonseca, B. D., Lahr, R. M., Damgaard, C. K., Alain, T., Berman, A. J. (2018). LARP1 on TOP of ribosome production. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 9(5):e1480. . <https://doi.org/10.1002/wrna.1480>.

Franco, J. R., Cecchi, G., Paone, M., Diarra, A., Grout, L., Kadima Ebeja, A., Simarro, P. P., Zhao, W., Argaw, D. (2022). The elimination of human African trypanosomiasis: Achievements in relation to WHO road map targets for 2020. *PLoS Negl Trop Dis*, 16(1):e0010047. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010047>.

Freire, E. R., Dhalia, R., Moura, D. M., da Costa Lima, T. D., Lima, R. P., Reis, C. R., Hughes, K., Figueiredo, R. C., Standart, N., Carrington, M., de Melo Neto, O. P. (2011). The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Mol Biochem Parasitol*, 176(1):25-36. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.011>.

Freire, E. R., Sturm, N. R., Campbell, D. A., de Melo Neto, O. P. (2017). The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. *Pathogens*, 27;6(4):55. <https://doi.org/10.3390/pathogens6040055>.

Fritz, M., Vanselow, J., Sauer, N., Lamer, S., Goos, C., Siegel, T. N., Subota, I., Schlosser, A., Carrington, M., Kramer, S. (2015). Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. *Nucleic Acids Res*, 43(16):8013-32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv731>.

Gao, J. M., Qian, Z. Y., Hide, G., Lai, D. H., Lun, Z. R., Wu, Z. D. (2020). Human African trypanosomiasis: the current situation in endemic regions and the risks for non-endemic regions from imported cases. *Parasitology*, 147(9):922-931. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000645>.

Goos, C., Dejung, M., Wehman, A., M-Natus, E., Schmidt, J., Sunter, J., Engstler, M., Butter, F., Kramer, S. (2018). Trypanosomes can initiate nuclear export cotranscriptionally. *Nucleic Acids Res*, 47, 266–282. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1136>.

Günzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L. C., Chung, H. M., Lee, P.T., Lee, M. G. (2003). RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, 2:542–551. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.542-551.2003>.

Haile, S., Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*, 10(6):569-77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.10.001>.

Hammarton, T. C. (2007). Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 153(1):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.01.017>.

BIBLIOGRAFÍA

Hammarton, T. C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M., Mottram, J. C. (2003). Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem*, 278(25):22877-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300813200>.

Hammarton, T. C., Engstler, M., Mottram, J. C. (2004). The *Trypanosoma brucei* cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. *J Biol Chem*, 279: 24757–24764. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401276200>.

Hashem, Y., des Georges, A., Fu, J., Buss, S. N., Jossinet, F., Jobe, A., Zhang, Q., Liao, H. Y., Grassucci, R. A., Bajaj, C., Westhof, E., Madison-Antenucci, S., Frank, J. (2013). High-resolution cryo-electron microscopy structure of the *Trypanosoma brucei* ribosome. *Nature*, 494(7437):385-9. <https://doi.org/10.1038/nature11872>.

He, C. Y., Ho, H. H., Malsam, J., Chalouni, C., West, C. M., Ullu, E., Toomre, D., Warren, G. (2004). Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, 165(3):313-21. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311076>.

Hellman, K. M., Ciganda, M., Brown, S. V., Li, J., Ruyechan, W., Williams, N. (2007a). Two trypanosome-specific proteins are essential factors for 5S rRNA abundance and ribosomal assembly in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, 6(10):1766–1772. <https://doi.org/10.1128/EC.00119-07>.

Hendriks, E. F., Matthews, K. R. (2005). Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. *Mol Microbiol*, 57(3):706-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04679.x>.

- Hendriks, E. F., Robinson, D. R., Hinkins, M., Matthews, K. R. (2001). A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *EMBO J*, 20(23):6700-11. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6700>.
- Hitchcock, R. A., Zeiner, G. M., Sturm, N. R., Campbell, D. A. (2004). The 3' termini of small RNAs in *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiol Lett*, 236(1):73-8. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.020>.
- Hochstetter, A., Pfohl, T. (2016). Motility, Force Generation, and Energy Consumption of Unicellular Parasites. *Trends Parasitol*, 32(7):531-541. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.006>
- Horn, D. (2014). Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 195, 123– 129. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.05.001>.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P).
- Jacobs, R. T., Nare, B., Wring, S. A., Orr, M. D., Chen, D., Sligar, J. M., Jenks, M. X., Noe, R. A., Bowling, T. S., Mercer, L. T., Rewerts, C., Gaukel, E., Owens, J., Parham, R., Randolph, R., Beaudet, B., Bacchi, C. J., Yarlett, N., Plattner, J. J., Freund, Y., Ding, C., Akama, T., Zhang, Y. K., Brun, R., Kaiser, M., Scandale, I., Don, R. (2011). SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human African trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(6):e1151. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001151>.

BIBLIOGRAFÍA

Jaremko, D., Ciganda, M., Williams, N. (2019a). Trypanosoma brucei homologue of regulator of ribosome synthesis 1 (Rrs1) has direct interactions with essential trypanosome specific proteins. *mSphere*, 4(4):e00453-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00453-19>.

Jaremko, D., Ciganda, M., Christen, L., Williams, N. (2019b). Trypanosoma brucei L11 Is Essential to Ribosome Biogenesis and Interacts with the Kinetoplastid-Specific Proteins P34 and P37. *mSphere*. 4(4): e00475-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00475-19>.

Jensen, B. C., Brekken, D. L., Randall, A. C., Kifer, C. T., Parsons, M. (2005). Species specificity in ribosome biogenesis: a nonconserved phosphoprotein is required for formation of the large ribosomal subunit in Trypanosoma brucei. *Eukaryot Cell*, 4(1):30-5. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.30-35.2005>.

Jensen, B. C., Ramasamy, G., Vasconcelos, E. J. R., Ingolia, N. T., Myler, P. J., Parsons, M. (2014) Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of Trypanosoma brucei. *BMC Genomics*, 15:911. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-911>.

Jensen, B. C., Sivam, D., Kifer, C. T., Myler, P. J., Parsons, M. (2009). Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of Trypanosoma brucei. *BMC Genomics*, 10:482. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-482>.

Jensen, B. C., Wang, Q., Kifer, C. T., Parsons, M. (2003). The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60S ribosomal subunit. *J Biol Chem*, 278(34):32204-32211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304198200>.

- Kamina, A. D., Jaremko, D., Christen, L., Williams, N. (2017). Essential assembly factor Rpf2 forms novel interactions within the 5S RNP in *Trypanosoma brucei*. *mSphere*, 2(5):e00394-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00394-17>.
- Keene, J. D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet*, 8(7):533-43. <https://doi.org/10.1038/nrg2111>. PMID: 17572691.
- Kelly, S., Reed, J., Kramer, S., Ellis, L., Webb, H., Sunter, J., Salje, J., Marinsek, N., Gull, K., Wickstead, B., Carrington, M. (2007). Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Mol Biochem Parasitol*, 154(1):103-9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.03.012>.
- Kennedy, P. G. E., Rodgers, J. (2019). Clinical and Neuropathogenetic Aspects of Human African Trypanosomiasis. *Front Immunol*, 10:39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00039>.
- Klein, C., Terrao, M., Clayton, C. (2017). The role of the zinc finger protein ZC3H32 in bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*, 12(5):e0177901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177901>.
- Klein C, Terrao M, Gil DI, Clayton C (2015) Polysomes of *Trypanosoma brucei*: Association with initiation factors and RNA-binding proteins. *PLoS One*, 10:e0135973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135973>
- Klingbeil, M. M., Englund, P. T. (2004). Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:4333–4334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401400101>.

BIBLIOGRAFÍA

Kohl, L., Sherwin, T., Gull, K. (1999). Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. *J Eukaryot Microbiol*, 46:105-109. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04592.x>.

Kramer, S. (2014). RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *WIREs RNA*, 5(2):263-84. <https://doi.org/10.1002/wrna.1207>.

Kramer, S. (2017). The ApaH-like phosphatase TbALPH1 is the major mRNA decapping enzyme of trypanosomes. *PLoS Pathog*, 13(6):e1006456. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006456>.

Kramer, S., Bannerman-Chukualim, B., Ellis, L., Boulden, E. A., Kelly, S., Field, M. C., Carrington, M. (2013). Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. *PLoS One*, 8(1):e54004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054004>.

Kramer, S., Kimblin, N. C., Carrington, M. (2010). Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *BMC Genomics*, 11:283. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-283>.

Kramer, S., Marnef, A., Standart, N., Carrington, M. (2012). Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. *J Cell Sci*, 125(Pt 12):2896-909. <https://doi.org/10.1242/jcs.099275>.

Kramer, S., Queiroz, R., Ellis, L., Webb, H., Hoheisel, J. D., Clayton, C. E., Carrington, M. (2008). Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. *J Cell Sci*, 121(Pt 18):3002-14. <https://doi.org/10.1242/jcs.031823>.

Kramer, S., Piper, S., Estevez, A., Carrington, M. (2016). Polycistronic trypanosome mRNAs are a target for the exosome. *Mol Biochem Parasitol*, 205(1-2):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.02.009>.

Kruger, T., Hofweber, M., Kramer, S. (2013). SCD6 induces RNP granule formation in trypanosomes in a translation-independent manner, regulated by its LSM and RGG domains. *Mol Biol Cell*, 24(13):2098-111. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0068>.

Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphew, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J. R., Gull, K. (2010). Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 123:2884–2891. <https://doi.org/10.1242/jcs.074161>.

Li, Z. (2012). Regulation of the Cell Division Cycle in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, 11(10): 1180–1190. <https://doi.org/10.1128/EC.00145-12>.

Liao, Y., Smyth, G. K., Shi, W. (2013). The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res*, 41: e108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt214>.

BIBLIOGRAFÍA

Liao, Y., Smyth, G. K., Shi, W. (2014). FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30:923–930.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.

Liu, B., Kamanyi Marucha, K., Clayton, C. (2020). The zinc finger proteins ZC3H20 and ZC3H21 stabilise mRNAs encoding membrane proteins and mitochondrial proteins in insect-form *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, 113(2):430-451. <https://doi.org/10.1111/mmi.14429>.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Lueong, S., Merce, C., Fischer, B., Hoheisel, J., Erben, E. (2016). Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. *Mol Microbiol*, 100(3):457-71. <https://doi.org/10.1111/mmi.13328>.

Mani, J., Güttinger, A., Schimanski, B., Heller, M., Acosta-Serrano, A., Pescher, P., Späth, G., Roditi, I. (2011). Alba-domain proteins of *Trypanosoma brucei* are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. *PLoS One*, 6(7):e22463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022463>.

Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., Nepomuceno-Mejía, T. (2019). Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa. *Cells*, 8(5):421. <https://doi.org/10.3390/cells8050421>.

- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., Myler, P. J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell*, 3:506–517. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.506-517.2004>.
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., Myler, P. J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*, 11:1291–1299. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00143-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00143-6).
- McCulloch, R. (2004). Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol*, 20(3):117-21. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.12.004>.
- McKean, P. G. (2003). Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol*, 6(6):600-7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.010>.
- McIntyre, A. B. R., Gokhale, N. S., Cerchietti, L., Jaffrey, S. R., Horner, S. M., Mason, C. E. (2020). Limits in the detection of m6A changes using MeRIP/m6A-seq. *Sci Rep*, 10(1):6590. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63355-3>.

BIBLIOGRAFÍA

Mesu, V. K. B. K., Kalonji, W. M., Bardonneau, C., Mordt, O. V., Blesson, S., Simon, F., Delhomme, S., Bernhard, S., Kuziena, W., Lubaki, J. F., Vuvu, S. L., Ngima, P. N., Mbembo, H. M., Ilunga, M., Bonama, A. K., Heradi, J. A., Solomo, J. L. L., Mandula, G., Badibabi, L. K., Dama, F. R., Lukula, P. K., Tete, D. N., Lumbala, C., Scherrer, B., Strub-Wourgaft, N., Tarral, A. (2018). Oral fexinidazole for late-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial. *Lancet*, 391(10116):144-154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32758-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32758-7).

Mesu, V. K. B. K., Mutombo Kalonji, W., Bardonneau, C., Valverde Mordt, O., Ngolo Tete, D., Blesson, S., Simon, F., Delhomme, S., Bernhard, S., Mahenzi Mbembo, H., Mpia Moke, C., Lumeya Vuvu, S., Mudji E'kitiak, J., Akwaso Masa, F., Mukendi Ilunga, M., Mpoyi Muamba Nzambi, D., Mayala Malu, T., Kapongo Tshilumbwa, S., Botalema Bolengi, F., Nkieri Matsho, M., Lumbala, C., Scherrer, B., Strub-Wourgaft, N., Tarral, A. (2021). Oral fexinidazole for stage 1 or early stage 2 African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a prospective, multicentre, open-label, cohort study. *Lancet Glob Health*, 9(7):e999-e1008. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00208-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00208-4).

Mishra, A., Kaur, J. N., McSkimming, D. I., Hegedúsová, E., Dubey, A. P., Ciganda, M., Paris, Z., Read, L. K. (2021). Selective nuclear export of mRNAs is promoted by DRBD18 in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, 116(3):827-840. <https://doi.org/10.1111/mmi.14773>.

Monk, S. L., Simmonds, P., Matthews, K. R. (2013). A short bifunctional element operates to positively or negatively regulate ESAG9 expression in different developmental forms of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 126(10):2294-304. <https://doi.org/10.1242/jcs.126011>.

Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Nepomuceno-Mejía, T., Rojas-Sánchez, S., Vélez-Ramírez, D. E., Padilla-Mejía, N. E., Figueroa-Angulo, E., Manning-Cela, R., Martínez-Calvillo, S. (2016). Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology*, *143*(14):1917-<https://doi.org/1929.10.1017/S0031182016001712>.

Moura, D. M., Reis, C. R., Xavier, C. C., da Costa Lima, T. D., Lima, R. P., Carrington, M., de Melo Neto, O. P. (2015). Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol*, *12*(3):305-19. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017233>.

Mugo, E., Erben, E. D. (2020). Identifying Trypanosome Protein–RNA Interactions Using RIP-Seq. *Methods Mol Biol*, *2116*:285-294. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0294-2_17.

Naguleswaran, A., Doiron, N., Roditi, I. (2018). RNA-Seq analysis validates the use of culture-derived *Trypanosoma brucei* and provides new markers for mammalian and insect life-cycle stages. *BMC Genomics*, *19*(1):227. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4600-6>.

Níttolo, A. G., Bañuelos, C. P., Saborit, J. I., Tekiel, V., Sánchez, D. O., Levy, G. V. (2018). TbRRM1 knockdown produces abnormal cell morphology and apoptotic-like death in the bloodstream form of *T. brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, *224*:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.07.006>.

BIBLIOGRAFÍA

Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T., Gull, K. (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*, 108:501–513.

<https://doi.org/10.1007/s004120050402>.

Ogbadoyi, E. O., Robinson, D. R., Gull, K. (2003). A high-order transmembrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell*, 14:1769–1779. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0525>.

Ooi, C. P., Benz, C., Urbaniak, M. D. (2020). Phosphoproteomic analysis of mammalian infective *Trypanosoma brucei* subjected to heat shock suggests atypical mechanisms for thermotolerance. *J Proteomics*, 219:103735. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103735>.

Ouna, B. A., Stewart, M., Helbig, C., Clayton, C. (2012) The *Trypanosoma brucei* CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13. *Mol Biochem Parasitol* 183:184–188. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.02.006>

Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol*, 53:717–724. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04203.x>.

Paterou, A., Walrad, P., Craddy, P., Fenn, K., Matthews, K. (2006). Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCCH protein that promotes trypanosome life-cycle development. *J Biol Chem*, 281(51):39002-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604280200>.

- Pitula, J., Ruyechan, W. T., Williams, N. (2002). Two novel RNA binding proteins from *Trypanosoma brucei* are associated with 5S rRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1):569-76. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6226>.
- Ploubidou, A., Robinson, D. R., Docherty, R. C., Ogbadoyi, E. O., Gull, K. (1999). Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *J Cell Sci*, 112 (Pt 24):4641-50. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.24.4641>.
- Priest, J. W., Hajduk, S. L. (1994). Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Bioenerg Biomembr*, 26, 179–191. <https://doi.org/10.1007/BF00763067>.
- Prohaska, K., Williams, N. (2009). Assembly of the *Trypanosoma brucei* 60S ribosomal subunit nuclear export complex requires trypanosome-specific proteins P34 and P37. *Eukaryot Cell*, 8(1):77-87. <https://doi.org/10.1128/EC.00234-08>.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 24(3):218-29. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1183>.
- Queiroz, R., Benz, C., Fellenberg, K., Hoheisel, J. D., Clayton, C. (2009). Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. *BMC Genomics*, 10:495. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-495>.

BIBLIOGRAFÍA

Quijada, L., Guerra-Giraldez, C., Drozd, M., Hartmann, C., Irmer, H., Ben-Dov, C., Cristodero, M., Ding, M., Clayton, C. (2002). Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, 30(20):4414-24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf577>.

Quinlan, A. R., Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26:841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.

Rajan, K. S., Chikne, V., Decker, K., Waldman Ben-Asher, H., Michaeli, S. (2019). Unique aspects of rRNA biogenesis in trypanosomatids. *Trends Parasitol*, 35(10):778-794. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.012>.

Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., Heyne, S., Dündar, F., Manke, T. (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res*, 44:W160–W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>.

Reynolds, D., Cliffe, L., Förstner, K. U., Hon, C. C., Siegel, T. N., Sabatini, R. (2014). Regulation of transcription termination by glucosylated hydroxymethyluracil, base J, in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*, 42(15):9717-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gku714>.

Rico-Jiménez, M., Ceballos-Pérez, G., Gómez-Liñan, C., Estévez, A. M. (2021). An RNA-binding protein complex regulates the purine-dependent expression of a nucleobase transporter in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, 49:3814–3825. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab181>

Rink, C., Ciganda, M., Williams, N. (2019). The Nuclear Export Receptors TbMex67 and TbMtr2 Are Required for Ribosome Biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *mSphere*, 4(4):e00343-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00343-19>.

Rink, C., Williams, N. (2019). Unique Interactions of the Nuclear Export Receptors TbMex67 and TbMtr2 with Components of the 5S Ribonuclear Particle in *Trypanosoma brucei*. *mSphere*, 4(4):e00471-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00471-19>.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2009). EdgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26:139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

Roditi, I., Liniger, M. (2002). Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. *Trends Microbiol*, 10(3):128-34. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)02309-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02309-0).

Romaniuk, M. A., Cervini, G., Cassola, A. (2016). Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites. *World J Biol Chem*, 7(1):146-57. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.146>.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH Protoc*, 1;2006(4):pdb.prot4540. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4540>.

BIBLIOGRAFÍA

Sakyiama, J., Zimmer, S. L., Ciganda, M., Williams, N., Read, L. K. (2013). Ribosome biogenesis requires a highly diverged XRN family 5'->3' exoribonuclease for rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, *19*(10):1419-31. <https://doi.org/10.1261/rna.038547.113>.

Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*, *6*(4):275-7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1314>.

Schurch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., Roditi, I. (1994). Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol*, *14*:3668-75. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3668-3675.1994>.

Skeiky, Y. A., Benson, D. R., Elwasila, M., Badaro, R., Burns, J. M. Jr., Reed, S. G. (1994). Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: Immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect Immun*, *62*(5):1643-51. <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.1643-1651.1994>.

Shan, F., Mei, S., Zhang, J., Zhang, X., Xu, C., Liao, S., Tu, X. (2019). A telomerase subunit homolog La protein from *Trypanosoma brucei* plays an essential role in ribosomal biogenesis. *FEBS J*, *286*(16):3129-3147. <https://doi.org/10.1111/febs.14853>.

Sherwin, T. and Gull, K. (1989). Visualisation of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell*, *57*(2):211-21. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90959-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90959-8).

Siegel, T.N., Hekstra, D. R., Kemp, L. E., Figueiredo, L. M., Lowell, J. E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S., Cross, G. A. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*, 23(9):1063-76. <https://doi.org/10.1101/gad.1790409>.

Siegel, T. N., Hekstra, D. R., Wang, X., Dewell, S., Cross, G. A. (2010). Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res*, 38(15):4946-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq237>.

Singh, A., Minia, I., Droll, D., Fadda, A., Clayton, C., Erben, E. (2014). Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. *Nucleic Acids Res*, 42:4652–4668. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1416>.

Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M. A., Guerra-Slompo, E. P., Garat, B., Goldenberg, S., Munroe, D. J., Dallagiovanna, B., Holetz, F., Sotelo-Silveira, J. R. (2015). Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 16(1):443. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1563-8>.

Smith, T. K., Bringaud, F., Nolan, D. P., Figueiredo, L. M. (2017). Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle. *F1000Res*, 6:F1000 Faculty Rev-683. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10342.2>.

BIBLIOGRAFÍA

Stevens, J. R. (2008). Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*, 15(3):226-32. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153226>.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*, 118(4):1301-10. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>.

Subota, I., Rotureau, B., Blisnick, T., Ngwabyt, S., Durand-Dubief, M., Engstler, M., Bastin, P. (2011). ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Mol Biol Cell*, 22(22):4205-19. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0511>.

Sung, M. K., Porras-Yakushi, T. R., Reitsma, J. M., Huber, F. M., Sweredoski, M. J., Hoelz, A., Hess, S., Deshaies, R. J. (2016). A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife*, 5:e19105. <https://doi.org/10.7554/eLife.19105>.

Sunter, J. D., Dean, S., Wheeler, R. J. (2023). TrypTag.org: from images to discoveries using genome-wide protein localisation in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol*, S1471-4922(23)00041-7. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.02.008>.

Tetty, M. D., Rojas, F., Matthews, K. R. (2022). Extracellular release of two peptidases dominates generation of the trypanosome quorum-sensing signal. *Nat Commun*, 13(1):3322. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31057-1>.

Tiengwe, C., Marcello, L., Farr, H., Gadelha, C., Burchmore, R., Barry, J. D., Bell, S. D., McCulloch, R. (2012). Identification of ORC1/CDC6-interacting factors in *Trypanosoma brucei* reveals critical features of origin recognition complex architecture. *PLoS One*, 7(3):e32674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032674>.

Tinti, M., Güther, M. L. S., Crozier, T. W. M., Lamond, A. I., Ferguson, M. A. J. (2019). Proteome turnover in the bloodstream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei* measured by quantitative proteomics. *Wellcome Open Res*, 4:152. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15421.1>.

Toh, J. Y., Nkouawa, A., Sánchez, S. R., Shi, H., Kolev, N. G., Tschudi, C. (2021). Identification of positive and negative regulators in the stepwise developmental progression towards infectivity in *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep*, 11(1):5755. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85225-2>.

Umaer, K., Ciganda, M., Williams, N. (2014). Ribosome biogenesis in african trypanosomes requires conserved and trypanosome-specific factors. *Eukaryot Cell*, 13(6):727-37. <https://doi.org/10.1128/EC.00307-13>.

Urbaniak, M. D., Guther, M. L. S., Ferguson, M. A. J. (2012). Comparative SILAC proteomic analysis of *trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. *PLoS One*, 7(5):e36619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036619>.

Vaughan, S., Gull, K. (2003). The trypanosome flagellum. *J Cell Sci*, 116:757–759. <https://doi.org/10.1242/jcs.00287>.

BIBLIOGRAFÍA

Walrad, P., Paterou, A., Acosta-Serrano, A., Matthews, K. R. (2009). Differential trypanosome surface coat regulation by a CCCH protein that co-associates with procyclin mRNA cis-elements. *PLoS Pathog*, 5(2):e1000317. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000317>.

Wedel, C., Förstner, K. U., Derr, R., Siegel, T. N. (2017). GT-rich promoters can drive RNA pol II transcription and deposition of H2A.Z in African trypanosomes. *EMBO J*, 36(17):2581-2594. <https://doi.org/10.15252/embj.201695323>.

Wirtz, E., Hartmann, C., Clayton, C. (1994). Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, 22(19):3887-94. <https://doi.org/10.1093/nar/22.19.3887>.

Wright, J. R., Siegel, T. N., Cross, G. A. (2010). Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 172(2):141-4. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.013>.

Woodward, R., Gull, K. (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 95 (Pt 1):49-57. <https://doi.org/10.1242/jcs.95.1.49>.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., Liu, X. S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*, 9(9):R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>.

Zhang, J., Williams, N. (1997). Purification, cloning, and expression of two closely related *Trypanosoma brucei* nucleic acid binding proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 87:145–158. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00060-1).

Zeiner, G. M., Hitchcock, R. A., Sturm, N. R., Campbell, D. A. (2004). 3'-End polishing of the kinetoplastid spliced leader RNA is performed by SNIP, a 3'→5' exonuclease with a Motley assortment of small RNA substrates. *Mol Cell Biol*, 24(23):10390-6. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10390-10396.2004>.

Zoltner, M., Krienitz, N., Field, M. C., Kramer, S. (2018). Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(7):e0006679. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006679>.

ANEXO I

ANEXO I

Transcritos asociados al complejo ZC3H41/Z41AP. El análisis de los transcritos enriquecidos se llevó a cabo utilizando MACS2 o edgeR. Aquellos con una puntuación MACS2 > 7000 se consideraron altamente probables de ser transcritos asociados al complejo ZC3H41/Z41AP. Los transcritos analizados por RT-PCR cuantitativa se indican en negrita y las proteínas analizadas por inmunotransferencia se muestran subrayadas.

GeneID	Descripción	MACS2	edgeR
Tb927.6.720	40S proteína ribosomal L14, putativa	74113	3,9
Tb927.9.14370	60S proteína ribosomal L26/L24, putativa	54233	2,8
Tb927.9.2020	60S proteína ribosomal L38, putativa	51279	3,3
Tb927.3.5050	60S proteína ribosomal L4	38504	3,1
Tb927.9.15170	60S proteína ribosomal L5, putativa	37810	2,8
Tb927.10.13500	60S proteína ribosomal L10a/L1	32428	3,1
Tb927.9.15110	60S proteína ribosomal L5, putativa	32029	3,1
Tb927.11.4300	60S proteína ribosomal L18, putativa	30933	2,6
Tb927.11.4820	60S proteína ribosomal L17/L22, putativa	29061	2,6
Tb927.11.3590	40S proteína ribosomal S4, putativa	28483	2,0
Tb927.11.14130	proteína ribosomal L18, putativa	28441	2,3
Tb927.10.9880	60S proteína ribosomal L18, putativa	28378	2,5
Tb927.9.14000	60S proteína ribosomal L12/L11, putativa	28207	2,4
Tb927.11.6180	60S proteína ribosomal L28e, putativa	25798	2,1
Tb927.11.6140	40S proteína ribosomal S15A, putativa	23926	2,0
Tb927.2.5060	Proteína de unión a GTP, putativa (ATPasa de unión a ribosoma)	22752	2,5
Tb927.9.15210	proteína ribosomal L36e, putativa	22439	2,3
Tb927.11.9710	60S proteína ribosomal L10a/L1, putativa	22350	2,3
Tb927.11.14020	<u>Dominio de unión a RNA nuclear</u> (NRBD2, p37)	22336	1,9
Tb927.10.2840	Proteína ribosomal S25, putativa	21012	2,1
Tb927.11.3600	40S proteína ribosomal S4, putativa	20949	2,3
Tb927.10.5030	ubiquitina/ proteína ribosomal S27a, putativa	19772	1,9
Tb927.8.1110	<u>40S proteína ribosomal S9, putativa</u>	19749	2,0
Tb927.10.11390	60S proteína ribosomal L6, putativa	19745	1,5
Tb927.11.7705	Proteína ribosomal S11, putativa	18220	2,0
Tb927.7.2340	40S proteína ribosomal S15, putativa	17906	2,1
Tb927.11.9700	Factor de transcripción BTF3, putativo	17904	2,2
Tb927.4.1860	Proteína ribosomal S19, putativa	17753	1,6
Tb927.8.4650	Proteína hipotética, conservada	17449	3,0

ANEXO I

Tb927.11.11725	Proteína ribosomal S14/S29e	17078	1,8
Tb927.10.3930	40S proteína ribosomal S3A, putativa	16761	1,6
Tb927.8.6030	60S proteína ribosomal L12/L11, putativa	16645	1,5
Tb927.10.10370	Proteína hipotética, conservada	16229	2,5
Tb927.10.1590	Proteína ribosomal L36, putativa	16183	1,9
Tb927.11.11230	60S proteína ribosomal L14, putativa	16094	1,8
Tb927.10.4110	60S proteína ribosomal L30	16019	1,5
Tb927.10.11540	40S proteína ribosomal S3, putativa	15614	1,3
Tb927.9.8420	Proteína QM- <i>like</i> (proteína ribosomal L16/L10e)	15511	2,4
Tb927.10.5610	40S proteína ribosomal S9, putativa	14413	1,6
Tb927.10.190	40S proteína ribosomal S6e, putativa	13965	1,5
Tb927.10.560	40S proteína ribosomal S11, putativa	13794	1,6
Tb927.6.4340	Ribonucleoproteína nuclear pequeña, putativa	13746	2,5
Tb927.9.11410	60S proteína ribosomal L23, putativa	12651	2,3
Tb927.11.1860	Histona H1	12486	2,0
Tb927.7.2370	40S proteína ribosomal S15, putativa	12461	2,1
Tb927.11.680	Proteína ribosomal L21E (60S), putativa	12339	1,4
Tb927.6.4690	60S proteína ribosomal L9/L6e, putativa	12146	1,4
Tb927.10.11210	Proteína hipotética, conservada (complejo tRNA metiltransferasa, TRM82)	11971	1,9
Tb927.4.3830	Proteína hipotética, conservada	11464	3,0
Tb927.9.3930	Proteína hipotética, conservada	11281	2,5
Tb927.8.1330	60S proteína ribosomal L7a, putativa	11071	2,0
Tb927.3.1370	40S proteína ribosomal S25, putativa	10990	1,3
Tb927.10.3940	40S proteína ribosomal S3A, putativa	10868	1,4
Tb927.9.11380	60S proteína ribosomal L23, putativa	10755	1,7
Tb927.11.10025	60S proteína ribosomal L29, putativa	10630	1,2
Tb927.6.2050	Proteína reguladora de la biogénesis ribosomal RRS1	10552	2,4
Tb927.8.6180	60S proteína ribosomal L26/L24, putativa	10338	1,2
Tb927.11.1800	Histona H1	10321	2,1
Tb927.10.5460	60S proteína ribosomal L24, putativa	10290	1,4
Tb927.7.1050	40S proteína ribosomal S16/S9, putativa	10128	1,5
Tb927.10.10750	metalo-peptidasa, Clan MC, Familia M14, putativa	9858	1,9
Tb927.10.1090	40S proteína ribosomal S23/S12, putativa	9817	
Tb927.4.3110	tRNA-dihidrouridina sintasa 4, putativa	9711	3,6
Tb927.4.2030	Proteína de unión a DNA/RNA Alba 4	9709	1,1

Tb927.7.3240	Proteína ribosomal mitocondrial SSU, putativa	9702	2,4
Tb927.11.16280	60S proteína ribosomal L8/L2, putativa	9633	1,2
Tb927.10.3280	60S proteína ribosomal L38, putativa	9405	1,1
Tb927.9.3990	Proteína ribosomal S7, putativa	9398	2,0
Tb927.9.15420	60S proteína ribosomal L32e	9345	1,1
Tb927.8.6033	Proteína ribosomal L41, putativa	9304	1,5
Tb927.7.1750	60S proteína ribosomal L7, putativa	9232	1,5
Tb927.10.9800	60S proteína ribosomal L22e	9183	1,2
Tb927.10.14660	Proteína hipotética, conservada	9150	2,6
Tb927.11.8200	Proteína ribosomal S26e, putativa	9106	1,1
Tb927.11.2060	<u>60S Proteína ribosomal ácida P0, putativa</u>	9024	2,1
Tb927.9.4960	Proteína hipotética, conservada	8987	1,2
Tb927.11.4290	40S proteína ribosomal S12	8937	1,4
Tb927.10.4120	60S proteína ribosomal L30	8878	1,6
Tb927.10.11330	Dominio par EF- <i>hand</i> , putativa	8871	2,0
Tb927.10.15120	40S proteína ribosomal S13, putativa	8616	
Tb927.10.7330	40S proteína ribosomal S24E, putativa	8581	
Tb927.10.13517	40S proteína ribosomal S27- <i>like</i> /S17e, putativa	8436	1,3
Tb927.8.2830	Proteína cinetocoro kinetoplástida 25	8245	1,7
Tb927.6.4020	Proteína hipotética, conservada	8218	1,8
Tb927.8.7860	4.6.1.1 (Adenilato ciclasa)	8144	2,0
Tb927.11.4370	Proteína hipotética, conservada	8020	2,8
Tb927.6.5130	60S proteína ribosomal ácida P2, putativa	8014	1,5
Tb927.4.4910	5.3.3.8 (Delta(3)-Delta(2)-enoi-CoA isomerasa)	7908	1,4
Tb927.10.9780	DEAD/H RNA helicasa dependiente de ATP, putativa	7854	1,7
Tb927.8.6150	40S proteína ribosomal S8, putativa	7709	1,2
Tb927.11.10030	60S proteína ribosomal L29, putativa	7536	1,6
Tb927.5.3140	Proteína hipotética, conservada	7525	2,3
Tb927.10.10250	EP2 prociclina	7507	1,4
Tb927.9.6910	Proteína hipotética, conservada	7460	2,2
Tb927.9.13785	Proteína de membrana kinetoplástida 11-5	7448	
Tb927.5.1610	60S proteína ribosomal L13a, putativa	7428	1,2
Tb927.8.4630	Proteína hipotética, conservada	7403	2,0
Tb927.11.6300	40S proteína ribosomal S5, putativa	7398	
Tb927.9.7620	60S proteína ribosomal L11, putativa	7340	

ANEXO I

Tb927.10.9370	Proteína hipotética, conservada	7205	2,4
Tb927.3.3320	60S proteína ribosomal L13e, putativa	7161	2,1
Tb927.11.11820	40S proteína ribosomal S17, putativa	7101	1,8
Tb927.10.4450	Proteína inducible por estrés STI1- <i>like</i> , putativa	7069	1,6
Tb927.10.11140	Proteína hipotética, conservada	7050	1,4
Tb927.11.13990	1.1.1.271 (GDP-L-fucosa sintasa)	6893	2,8
Tb927.10.14210	subunidad del factor de transcripción basal TFIIH	6870	1,9
Tb927.8.5880	Factor de iniciación de la traducción eucariota 1A, putativo	6829	2,0
Tb927.6.4980	40S proteína ribosomal S14	6745	1,2
Tb927.8.7000	Enzima activadora de ubiquitina E1- <i>like</i> , putativa	6708	1,9
Tb927.9.9120	2.1.1.33 (tRNA (guanina(46)-N(7))-metiltransferasa), TRM8 homólogo	6690	1,7
Tb927.5.390	75 kDa glicoproteína de superficie invariable, putativa	6675	2,9
Tb927.10.12680	60S proteína ribosomal L34, putativa	6641	
Tb927.4.3580	Factor de transcripción Pcc1, putativo	6607	2,0
Tb927.7.5180	60S proteína ribosomal L23a, putativa	6559	1,2
Tb927.8.1340	60S proteína ribosomal L7a, putativa	6544	2,4
Tb927.11.3230	60S proteína ribosomal L44e	6487	
Tb927.10.13530	Proteína hipotética	6397	
Tb927.3.860	Proteína transportadora de acilo, mitocondrial	6290	1,1
Tb927.9.15010	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subunidad del subcomplejo beta, putativo	6264	1,7
Tb927.2.4955	Producto no especificado	6151	2,4
Tb927.7.6760	Proteína hipotética, conservada	6121	1,9
Tb927.10.6370	60S proteína ribosomal L37e, putativa	6112	
Tb927.11.9730	60S proteína ribosomal L34, putativa	6093	
Tb927.3.4760	proteína dinamina-1 <i>like</i>	6047	
Tb927.7.230	40S proteína ribosomal S33/S28e, putativa	6029	1,4
Tb927.11.6490	Proteína hipotética, conservada	6001	2,1
Tb927.5.630	3.1.3.2 (Fosfatasa ácida)	5950	
Tb927.10.9390	Macrocin-O-metiltransferasa (TylF), putativa	5875	3,1
Tb927.9.9210	60S proteína ribosomal L37, putativa	5853	1,3
Tb927.11.15090	Proteína hipotética, conservada	5838	1,5
Tb927.8.2730	Proteína hipotética, conservada	5836	2,1
Tb927.8.2735	Producto no especificado	5836	

Tb927.11.11435	Cadena ligera de dineína tipo 1, putativa	5735	1,6
Tb927.1.3030	6.5.1.3 (RNA ligasa (ATP))	5734	2,1
Tb927.4.3610	3.1.3.16 (Proteína-serin/treonin fosfatasa)	5657	2,2
Tb927.11.2960	Proteína hipotética, conservada	5635	1,9
Tb927.11.7880	Proteína hipotética, conservada	5613	1,8
Tb927.9.13650	Factor de ribosilación de ADP, putativo	5566	1,3
Tb927.9.12240	60S proteína ribosomal L31, putativa	5557	
Tb927.8.5320	Proteína hipotética, conservada	5528	1,9
Tb927.8.5260	60S proteína ribosomal L39e, putativa	5443	
Tb927.7.370	Proteína hipotética, conservada	5421	1,5
Tb927.11.1000	proteína del cinetocoro kinetoplástida 16	5415	1,9
Tb927.11.11830	40S proteína ribosomal S17, putativa	5413	
Tb927.10.7760	Proteína hipotética, conservada	5342	2,1
Tb927.11.10800	Dominio de función desconocido (DUF4496), putativo	5330	2,2
Tb927.9.8070	Proteína QM-like	5327	1,8
Tb927.7.2290	Proteína hipotética, conservada	5323	1,4
Tb927.7.1380	Proteína hipotética, conservada	5300	1,7
Tb927.10.11000	Proteína hipotética, conservada	5257	1,8
Tb927.4.1580	Proteína que contiene dominio WW, putativa	5257	1,4
Tb927.8.5520	Proteína hipotética, conservada	5254	1,8
Tb927.11.13007	Ubiquitina-60S proteína ribosomal L40	5247	
Tb927.10.12990	Proteína de la familia de repeticiones de anquirina	5222	2,3
Tb927.9.10680	RNA polimerasa III RPC4, putative	5214	2,9
Tb927.8.595	Proteína hipotética	5185	1,8
Tb927.11.6080	Proteína hipotética, conservada	5174	2,8
Tb927.11.7900	Proteína de unión a RNA mitocondrial 16	5129	
Tb927.4.990	Proteína hipotética, conservada	5114	2,9
Tb927.3.770	Proteína ribosomal mitocondrial SSU, putativa	5070	1,6
Tb927.9.2110	Proteína hipotética, conservada	5067	1,9
Tb927.10.15150	Subunidad C11 de RNA polimerasa III, putativa (RPC11)	5062	1,6
Tb927.5.3090	Subunidad mitocondrial ATP sintasa, putativa	5059	1,1
Tb927.10.3160	Proteína hipotética, conservada	4994	2,3
Tb927.5.1110	60S proteína ribosomal L8e, putativa	4989	
Tb927.7.6810	Dominio pae EF-hand, putativo	4969	1,4
Tb927.3.3310	60S proteína ribosomal L13, putativa	4957	1,9

ANEXO I

Tb927.3.640	Proteína hipotética, conservada	4956	1,7
Tb927.2.5250	Tubulina-tirosina ligasa, putativa	4938	2,3
Tb927.3.3370	Proteína de dominio SET 29	4917	2,4
Tb927.7.4820	Proteína Trm112p-like, putativa	4886	1,5
Tb927.11.14000	<u>dominio de unión de RNA nuclear 1 (NRBD1, p34)</u>	4823	1,2
Tb927.1.3180	40S proteína ribosomal S11, putativa	4777	
Tb927.4.1520	Proteína de la familia de los simios, putativa	4746	2,4
Tb927.3.2840	3.6.1.1 (Difosfatasa inorgánica)	4707	1,8
Tb927.2.5830	Proteína hipotética, conservada	4689	2,5
Tb927.10.7070	Pequeña proteína activadora de RNA nuclear	4666	1,2
Tb927.10.16160	Proteína serin/treonin quinasa del grupo STE, putativa	4664	2,1
Tb927.10.220	60S proteína ribosomal L37a, putativa	4647	1,3
Tb927.9.10850	Subunidad 10 factor <i>splicing</i> 3B (SF3b10), putativa	4646	1,8
Tb927.9.7740	3.1.3.48 (Proteína-tirosin-fosfatasa)	4639	1,4
Tb927.11.15880	60S proteína ribosomal L27, putativa	4636	
Tb927.9.8710	Proteína dependiente de cardiolipina 19kDa	4621	2,0
Tb927.10.10160	Factor 4 de poliadenilación de kinetoplastos	4596	3,4
Tb927.2.5850	Ribonucleoproteína nuclear pequeña SmD2	4591	1,2
Tb927.3.3710	<i>Scavenger mRNA decapping enzyme C-term binding</i> , putativa	4579	1,9
Tb927.7.5170	60S proteína ribosomal L25	4564	1,6
Tb927.8.4470	Proteína chaperona DnaJ, putativa	4551	2,5
Tb927.11.800	Subunidad <i>prefoldin</i> , putativa	4541	1,1
Tb927.2.3920	Proteína del complejo 1 (familia LYR), putativa	4500	1,8
Tb927.8.4695	Proteína hipotética	4499	2,0
Tb927.11.5790	Proteína hipotética, conservada	4490	1,5
Tb927.4.1420	Proteína hipotética, conservada	4478	2,3
Tb927.7.1025	Proteína hipotética	4471	2,3
Tb927.4.3550	60S proteína ribosomal L13a, putativa	4425	
Tb927.6.3770	Proteína hipotética, conservada	4386	1,9
Tb927.10.14710	40S proteína ribosomal S2, putativa	4353	1,2
Tb11.NT.99	RNA no codificante, putativo	4316	
Tb927.2.2990	Proteína hipotética, conservada	4299	1,9
Tb927.7.3220	4.3.2.- (Liasas que actúan sobre amidas, amidinas, etc.)	4227	1,9

ANEXO II

ANEXO II

Ceballos-Pérez et al. *Parasites & Vectors* (2023) 16:118
<https://doi.org/10.1186/s13071-023-05728-x>

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



Role of the RNA-binding protein ZC3H41 in the regulation of ribosomal protein messenger RNAs in trypanosomes

Gloria Ceballos-Pérez¹, Miriam Rico-Jiménez^{1,2}, Claudia Gómez-Liñán¹ and Antonio M. Estévez^{1*}

Abstract

Background Trypanosomes are single-celled eukaryotes that rely heavily on post-transcriptional mechanisms to regulate gene expression. RNA-binding proteins play essential roles in regulating the fate, abundance and translation of messenger RNAs (mRNAs). Among these, zinc finger proteins of the cysteine3histidine (CCCH) class have been shown to be key players in cellular processes as diverse as differentiation, regulation of the cell cycle and translation. ZC3H41 is an essential zinc finger protein that has been described as a component of spliced leader RNA granules and nutritional stress granules, but its role in RNA metabolism is unknown.

Methods Cell cycle analysis in ZC3H41- and Z41AP-depleted cells was carried out using 4',6-diamidino-2-phenylindole staining, microscopic examination and flow cytometry. The identification of ZC3H41 protein partners was done using tandem affinity purification and mass spectrometry. Next-generation sequencing was used to evaluate the effect of ZC3H41 depletion on the transcriptome of procyclic *Trypanosoma brucei* cells, and also to identify the cohort of mRNAs associated with the ZC3H41/Z41AP complex. Levels of 5S ribosomal RNA (rRNA) species in ZC3H41- and Z41AP-depleted cells were assessed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Surface sensing of translation assays were used to monitor global translation.

Results We showed that depletion of the zinc finger protein ZC3H41 resulted in marked cell cycle defects and abnormal cell morphologies. ZC3H41 was found associated with an essential protein, which we named Z41AP, forming a stable heterodimer, and also with proteins of the poly(A)-binding protein 1 complex. The identification of mRNAs associated with the ZC3H41/Z41AP complex revealed that it is primarily composed of ribosomal protein mRNAs, and that binding to target transcripts is diminished upon nutritional stress. In addition, we observed that mRNAs encoding several proteins involved in the maturation of 5S rRNA are also associated with the ZC3H41/Z41AP complex. Finally, we showed that depletion of either ZC3H41 or Z41AP led to the accumulation of 5S rRNA precursors and a decrease of protein translation.

Conclusions We propose that ZC3H41 and Z41AP play important roles in controlling the fate of ribosomal components in response to environmental cues.

Keywords RNA-binding proteins, *Trypanosoma brucei*, Ribosomal proteins, 5S ribosomal RNA, Zinc finger proteins, RNA immunoprecipitation sequencing

*Correspondence:
 Antonio M. Estévez
 aesteve@ipb.csic.es
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

RNA transcription, processing, modification, translation and turnover constitute a central part of cell physiology [1]. RNA metabolism often deviates dramatically from eukaryotic paradigms in trypanosomatid protozoa [2]. In these early branch organisms, RNA polymerase II transcription is polycistronic and seems to be unregulated. Individual messenger RNAs (mRNAs) are generated by coupled trans-splicing of a spliced leader (SL) RNA at the 5'-end, and polyadenylation at the 3'-end [3], leaving little room for regulation in a classical transcriptional manner. Instead, regulation of gene expression is exerted post-transcriptionally at the levels of mRNA processing, transport, mRNA turnover and translation [4]. Processing of ribosomal RNAs (rRNAs) is also unusual in trypanosomatids, as the large subunit rRNA is cleaved at several sites to yield seven stable RNA fragments [5]. Large and small subunit rRNAs, as well as 5.8S rRNA, are transcribed by RNA polymerase I, whereas RNA polymerase III transcribes 5S rRNA. Processing of RNA polymerase I-derived rRNA species requires the RNA exosome [6], the RNA helicases MTR4 and Hel66 [7, 8], and small nucleolar RNAs [9] among other factors. Proteins involved in 5S processing, on the other hand, include nuclear RNA binding domain 1 (NRBD1) and NRBD2 (p34 and p37, respectively) [10], ribosome biogenesis regulator 1 homolog (RRS1) [11], the ribosomal proteins L5 and L11 [12, 13], and a telomerase subunit La protein [14].

The family Trypanosomatidae includes many parasitic species, which are responsible for important diseases in impoverished countries around the world [15]. *Trypanosoma brucei* is the organism of choice for functional analyses in trypanosomatids, and is responsible for human and animal trypanosomiasis in sub-Saharan Africa. Trypanosomes alternate between insect (tsetse fly) and mammalian hosts, including humans, and undergo profound changes in their transcriptomes and proteomes in order to adapt to the contrasting environments they face in their life cycle [16]. Trypanosome cells proliferate as procyclic forms in the insect midgut, and migrate to the salivary glands to differentiate into non-dividing metacyclic forms, which are then transmitted through fly bites into the mammalian bloodstream. Metacyclic trypanosomes differentiate first into proliferative bloodstream forms, which in turn develop into quiescent stumpy forms that are transferred to the tsetse fly and differentiate to procyclic forms, thus completing the cycle [17].

As expected for organisms with little transcriptional control, RNA-binding proteins are of paramount importance in controlling the final levels of mRNAs and proteins [18, 19]. Among these, zinc finger proteins of the cysteine3histidine (CCCH) family have been shown to

play important roles in many aspects of mRNA metabolism [19, 20]. There are 48 CCCH zinc finger proteins encoded in the genome of *T. brucei*, most of which do not seem to have homologs in other eukaryotes [20]; some of them have been studied in some detail. For example, ZFP1, ZFP2 and ZC3H18 have been shown to be involved in the differentiation of the parasite [21–23], while other zinc finger proteins, such as ZC3H5, ZC3H11, ZC3H20, ZC3H22, ZC3H32 and ZFP3 [24–29], seem to regulate mRNA turnover and translation.

ZC3H41 is an intriguing essential zinc finger protein that was detected through SL-RNA affinity purification [30], and is a component of both SL RNA granules and nutritional stress granules [30, 31]. In a previous study, we found that ZC3H41 bound non-specifically to a purine-responsive RNA regulatory element, probably as a consequence of the interaction with the SL bridging sequence used for RNA chromatography [32]. Moreover, ZC3H41 seems to accumulate in vesicles that are released into the extracellular medium [30]. In order to gain insight into the role of this protein in RNA metabolism, we analyzed the transcriptome of ZC3H41-depleted trypanosomes and also the subset of mRNAs associated with this protein. We found that ribosomal protein mRNAs, as well as transcripts encoding several factors involved in the maturation of 5S rRNA, are particularly enriched in the ZC3H41-bound transcriptome. We also show that ZC3H41 plays a role in the maturation of 5S rRNA, and that its depletion results in a decrease of global translation.

Methods

Trypanosome culture

Trypanosoma brucei 449 procyclic cells [33] were grown at 28 °C in SDM-79 medium [34] containing 10% fetal bovine serum. For starvation experiments, cells were collected from logarithmic cultures, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in the original volume of PBS and incubated at 28 °C for 3 h with gentle shaking. Transgenic trypanosomes were obtained following standard procedures [35].

Expression of tandem affinity purification fusion proteins and immunoblot

For expression of N-terminal tandem affinity purification (TAP) tagged proteins, fragments of ZC3H41 (Tb927.11.1980) or Z41AP (Tb927.7.7460) open reading frames (ORFs) were cloned into p2676 [36] to yield pGR307 and pGR315, respectively. These plasmids were transfected into procyclic 449 cells and selected in the presence of 1 µg/ml puromycin. Oligonucleotides used for cloning are described in Additional file 1. Detection of TAP-tagged proteins was carried out by immunoblot

analysis using Papanicolaou reagent (Sigma) or an anti-protein A antibody (Sigma), whereas 4xTy-tagged protein levels were monitored using a BB2 monoclonal antiserum [37]. Other antisera used were anti- α -tubulin (clone B-5-1-2; Sigma), anti-p34/p37 (NRBD1/2; [38]), anti-P0 [39], anti-S9 [unpublished; a kind gift from Christine Clayton (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, Heidelberg)], anti-DRBD3 [40], anti-RRP4 [6] and anti-puromycin (clone 12D10; Sigma). To prepare total cell extracts for immunoblot analysis, cells were harvested from logarithmic cultures, lysed in Laemmli buffer, boiled, and loaded directly in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels ($1-2 \times 10^6$ cells/lane). Proteins were visualized using either chemiluminescence or an Odyssey CLx Near-Infrared Fluorescence Imaging System (LI-COR Biosciences).

RNA interference

For RNA interference (RNAi) studies, a stem-loop strategy was followed to generate double-stranded RNA [35]. A fragment of the *ZC3H41* gene corresponding to the last 398 base pairs (bp) of the ORF plus 101 bp of the 3'-untranslated region, or a fragment of the *Z41AP* gene corresponding to the last 381 bp of the ORF plus 16 bp of the 3'-untranslated region, were amplified and cloned into pGR19 [35] to yield pGR309 and pGR318, respectively. Additionally, an alternative RNAi plasmid was generated for *ZC3H41* using a fragment corresponding to positions 736–1101 of the ORF to yield pGR440. Trypanosomes expressing TAP-ZC3H41 or TAP-Z41AP were transfected with NotI-linearized pGR309, pGR318 or pGR440 and selected in the presence of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromycin. For RNAi induction, tetracycline was added to the culture medium at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Immunofluorescence and cell cycle analysis

Immunolocalization studies were carried out as previously described [40] using an anti-protein A antiserum (Sigma). For cell cycle analysis using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and microscopic examination, uninduced or *ZC3H41*-depleted cells were counted on slides of fixed trypanosomes labeled with DAPI. To aid the visualization of cells, trypanosomes were incubated with an anti-EP1 monoclonal antibody (Cedarlane). At least 500 cells were counted for each time point. For cell cycle analysis using flow cytometry, 2.5×10^7 trypanosomes from uninduced or RNAi-induced cultures were collected by centrifugation at 1400 g for 10 min at 4 °C and washed once in cold PBS. Cell pellets were fixed overnight at -20 °C in 70% cold ethanol, washed once in cold PBS, resuspended in 0.5 ml PBS containing 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (Sigma) and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A (Thermo Scientific), and incubated for

30 min at room temperature. The DNA content of propidium iodide-stained cells was measured with either a FACSCalibur or a FACSymphony flow cytometer (Becton Dickinson) using a FL3 detector. The percentages of cells in subG1, G1/S and G2/M phases, as well as those having more than two nuclei ($>2N$), were determined using the FlowJo software. For each time point, 20,000 events per sample were measured. Gates were set manually using uninduced cells, and the same settings were applied to all samples.

TAP and mass spectrometry

Protein complexes were purified from $1-2 \times 10^{10}$ cells using the TAP method [41] with the modifications described in [42]. After SYPRO staining, individual bands were excised, subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight/time-of-flight analysis in a UltrafleXtreme mass spectrometer (Bruker). Protein identification was assigned by peptide mass fingerprinting and confirmed by MS/MS analysis of at least two peptides in each sample. Mascot 2.0 search engine (Matrix Science) was used for protein identification. RNase A + T1 treatment was carried out as in [42].

Ultraviolet crosslinking and polynucleotide kinase assays

The method described in [43] was followed with some modifications, whereby 2×10^9 trypanosome cells expressing TAP fusion proteins were washed in serum-free SDM-79 medium, and resuspended in 2 ml of ice-cold Voorheis's-modified PBS (PBS supplemented with 10 mM glucose and 46 mM sucrose). Half of the cells were ultraviolet (UV) irradiated twice at 400 mJ/cm^2 in a Stratalinker apparatus (Stratagene) in a single well of a 6-well culture plate on ice. Cell suspensions were centrifuged, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. Pellets were resuspended in 0.5 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM MgCl_2 , 0.5% IGEPAL CA-630, and protease inhibitors (complete mini ethylenediaminetetraacetic acid-free cocktail; Roche) and lysed by brief vortexing. Cell extracts were centrifuged at 16,000 g for 10 min at 4 °C. Supernatants were treated with 100 μg of RNaseA (Sigma) and 10 units of DNase I (Promega) for 30 min on ice; NaCl was added at a final concentration of 150 mM, and the mixture was incubated for 2 h at 4 °C in the presence of 1 mg of paramagnetic epoxy beads (M-270; Invitrogen) coupled with rabbit immunoglobulin G (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Beads were washed four times with 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 M NaCl, 0.5% IGEPAL and twice with T4 polynucleotide kinase (PNK; Promega) buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0.1% IGEPAL CA-630), resuspended in 20 μl PNK buffer containing

30 μCi [γ - ^{32}P]ATP (6000 Ci/mmol; Perkin Elmer) and 10 units of PNK (Promega), incubated for 20 min at 37 °C in a Thermomixer at 800 r.p.m., washed thrice in PNK buffer lacking DTT, and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for PhosphorImager analysis and immunoblot.

High-throughput sequencing and bioinformatics

For transcriptome analyses of ZC3H41-depleted trypanosomes, RNAi was induced for 2 days, and total RNA was obtained using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). mRNA libraries were obtained using the TruSeq Stranded mRNA sample preparation protocol (Illumina). Biological triplicates were processed in parallel with a high-throughput sequencing (RNA-seq) of control procyclic 449 cells described in [44] [Gene Expression Omnibus (National Center for Biotechnology Information; NCBI) series GSE186570; samples GSM5655679, GSM5655680 and GSM5655681] and sequenced at the Genomics Unit of the Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”–Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Granada, Spain) using a NextSeq 500 platform (Illumina). To identify transcripts associated with ZC3H41/Z41AP complexes (RNA immunoprecipitation sequencing; RIP-seq), two independent purifications from cell lines expressing TAP-Z41AP were processed in parallel with a RIP-seq of the PuREBP1/2 complex described in [32] [Gene Expression Omnibus (NCBI) series GSE145466; samples GSM4318666, GSM4318667, GSM4318669 and GSM4318671].

The resulting 76-nucleotide paired-end sequences were checked for quality using FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and mapped to the *T. brucei* 11 megabase chromosomes (TREU927, version 5.7) using the align module of the Subread package (Rsubread version 1.34.7; [45]) with the options `nTrim5=4`, `nTrim3=1`, `unique=TRUE`. Pearson correlation coefficients between replicates were >0.980 in all cases.

For differential expression analysis, reads assignment to mRNAs and counting were carried out using the featureCounts program of the Subread package (version 1.5.0-p [46]) with parameters `-p -B -C -ignoreDup -Q 20`. Counts were analyzed using edgeR (version 3.36.0; [47]); only genes containing more than one count per million mapped reads in at least three samples were considered. For Pearson correlation analysis, counts per million mapped reads were normalized using the trimmed means of the M values method [47] and transformed to \log_2 in edgeR. For coverage plots, regions of interest were binned and counted (sliding window, 100 bp; step size,

10 bp) using the countReadsPerBin module of deepTools API (version 3.5.0; [48]), and corrected for library size.

RIP-seq data were analyzed using either edgeR as above, comparing input RNA with immunoprecipitated RNA samples, or peak calling with MACS2 (version 2.2.7.1, [49]). In the latter case, peak calling was performed using the module callpeak on the binary alignment map (BAM) files obtained after alignment to the reference genome; the options were `-q 0.005 -g 3.5e7 -nomodel -f BAMPE`. BAM files corresponding to input RNA were used as controls for the peak calling. The resulting narrowPeak files obtained from both biological duplicates were intersected using the intersect module of bedtools [50] with options `-f 0.9 -r`. The final peak list was further intersected with a browser extensible data file containing the coordinates of all genes (ORFs plus untranslated regions) present in the *T. brucei* 11 megabase chromosomes (TREU927; version 5.7) using option `-f 0.5`.

Gene ontology analysis was performed in TriTrypDB [51] using gene ontology slim terms; evidence was set to both computed and curated.

Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction

PCR conditions, calculations and small-scale RNA immunoprecipitations were done as described [32] using *AATP11* mRNA (Tb927.4.4730) as a reference. All quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments were performed with at least three biological replicates. Oligodeoxynucleotide pairs used are listed in Additional file 1.

Translation assay

The surface sensing of translation assay [52] was used to monitor global translation according to a procedure described for trypanosomes [8]. Briefly, 1×10^7 trypanosomes were deposited in 24-well plates, incubated in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin for 30 min at 28 °C, washed in serum-free medium at the same temperature and subjected to immunoblot analysis as described above. Two controls were included: cells not treated with puromycin, and cells incubated for 30 min with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cycloheximide prior to the addition of puromycin. Puromycinylated peptides were detected with an anti-puromycin antibody (clone 12D10, 1:5000; Sigma) in an Odyssey Imaging System, and quantified using Image Studio (version 5.2; LI-COR Biosciences). DRBD3, which is stable over the course of the experiment [53], was used for normalization.

Results

Depletion of ZC3H41 results in severe cell cycle defects

To gain more insight into the function of ZC3H41, depletion *in vivo* using RNAi was used. We first generated a trypanosome procyclic cell line that expressed a TAP-tagged version from the endogenous locus. TAP-ZC3H41 was detected as a single band of the expected size in western blot analysis of total cell extracts (Additional file 2). Endogenous ZC3H41 is mainly a cytosolic protein [30, 54] and TAP-ZC3H41 localized also in the cytosol, as judged by immunofluorescence assays using antibodies against the TAP tag (Additional file 2). Trypanosomes expressing TAP-tagged ZC3H41 were further transfected with a vector expressing double-stranded RNA against ZC3H41 in a tetracycline-inducible manner. TAP-ZC3H41 was efficiently depleted upon tetracycline induction, and a marked reduction in cell growth was observed (Fig. 1a), indicating that ZC3H41 is essential

in procyclic trypanosomes, in agreement with previous results [30].

ZC3H41-depleted cells were examined for morphological and karyotypic defects using DAPI staining and microscopic examination. We could detect small cells corresponding to anucleate parasites after 1–2 days of RNAi induction (0N1K or zoids; Fig. 1b). Cells exhibiting an elongated end (nozzle phenotype; [21]) were observed after 3 days of ZC3H41 ablation (Fig. 1c). A time-dependent reduction in the proportion of cells containing one nucleus and one kinetoplast (1N1K; which are in the G1 or S phases of the cell cycle [55]), and a concomitant increase in zoids and multinucleated cells (>2N) was readily observed; after 2 days of RNAi induction, the majority of cells had aberrant karyotypes (Fig. 1d). Both the decrease in 1N1K cells and the increase in >2N species were confirmed by flow cytometry (Fig. 1e; representative flow cytometry plots can be seen in Additional file 2). Inhibition of trypanosome

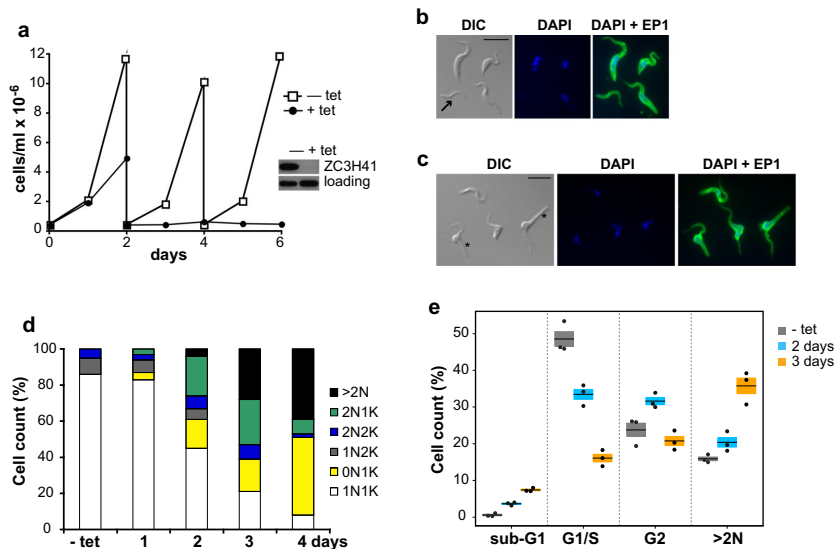


Fig. 1a–e Depletion of ZC3H41 leads to abnormal cell morphologies and defects in cell division. **a** Effect of ZC3H41 depletion on cell growth. Cells expressing tandem affinity purification (TAP) tag-ZC3H41 were transfected with a plasmid expressing double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to ZC3H41 in a tetracycline (tet)-inducible fashion. Cell cultures were followed for up 6 days and diluted every 2 days as needed. Depletion of TAP-ZC3H41 was confirmed by western blot after 2 days of tet induction (inset); RRP4 was included to assess equal loading. **b, c** Analysis of cell morphology in ZC3H41-depleted cells that were RNA interference (RNAi)-induced for 2 (**b**) or 3 (**c**) days with tet. Cells were stained with an anti-EP1 antibody to aid in their visualization, and mounted in mounting medium containing diamidino-2-phenylindole (DAPI). Bar represents 10 μ m. A zoid is indicated with an arrow in **b**; multinucleated cells exhibiting the 'nozzle phenotype' are indicated with asterisks in **c**. **d** Nucleus (N) and kinetoplast (K) configurations of individual cells were analyzed by DAPI staining. The percentage of cells with physiological (1N1K, 1N2K and 2N2K) or aberrant karyotypes (0N1K, 2N1K and >2N) is shown for uninduced (– tet) or ZC3H41-depleted cells induced for 1, 2, 3 or 4 days with tet. **e** Cell cycle analysis of uninduced (– tet) or ZC3H41-depleted cells induced for 2 or 3 days with tet. Percentages of cells in sub-G1, G1/S or G2 phases, as well as those having more than two nuclei (>2N), are expressed as the mean (horizontal lines) \pm SEM (shaded areas) of three independent RNAi inductions (dots)

growth and appearance of zoids and ‘nozzled cells’ were also observed when a different, non-overlapping gene fragment was used for RNAi-mediated ablation of ZC3H41 (Additional file 3), which ruled out off-target effects.

ZC3H41 forms a heterodimer with Tb927.7.7460

We used the TAP technique to assess whether ZC3H41 binds to other proteins in the cell. ZC3H41 was found associated in apparent stoichiometry with a 22-kDa

protein, Tb927.7.7460, and to a lesser extent with several other proteins (Fig. 2a; Additional file 4). Tb927.7.7460, henceforth named ZC3H41-associated protein (Z41AP), which is also mainly cytosolic [54], contains a SKP1 motif (S-phase kinase-associated protein, a component of the ubiquitin ligase complex; [51]), and was also detected upon SL-RNA affinity purification ([30]; named p22 in that study). We performed a reciprocal TAP using Z41AP as bait, and obtained a very similar protein pattern, of which ZC3H41 was the most prominent band in this

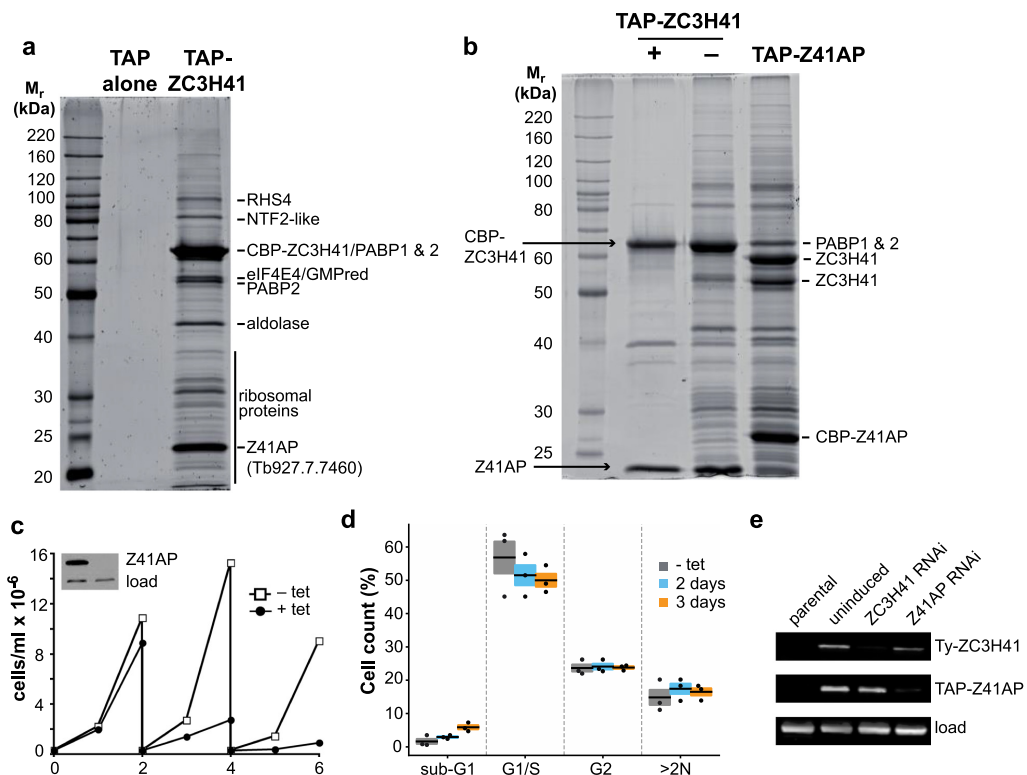


Fig. 2a–e ZC3H41 is found associated with Tb927.7.7460 (Z41AP) in a stable complex. **a, b** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/SYPRO staining of TAPs using TAP alone, TAP-ZC3H41 or TAP-Z41AP proteins as baits. The calmodulin binding peptide (CBP) tag remains after tobacco-etch virus (TEV) protease cleavage in the TAP procedure. Proteins identified by mass spectrometry are indicated (a complete list is presented in Additional file 4: Table S2). TAP-ZC3H41 purifications carried out in the absence (–) or presence (+) of RNases A and T1 are shown in **b, c**. Z41AP is essential in procyclic trypanosomes. A cell line expressing TAP-Z41AP was transfected with a plasmid producing dsRNA corresponding to Z41AP in a tet-dependent manner. Cell cultures were followed for up to 6 days and diluted every 2 days as needed. Depletion of TAP-Z41AP was confirmed by immunoblot after 2 days of tet induction (inset; see also **e**); RRP4 was used to assess equal loading. **d** Cell cycle analysis of uninduced (– tet) or Z41AP-depleted cells induced for 2 or 3 days with tet. Percentages of cells in sub-G1, G1/S or G2 phases, as well as those having more than two nuclei (> 2N), are expressed as the mean (horizontal lines) ± SEM (shaded areas) of three independent RNAi inductions (dots). **e** Effect of ZC3H41 or Z41AP depletion on the levels of the corresponding protein partner. A cell line expressing both 4xTy-ZC3H41 and TAP-Z41AP was transfected with plasmids expressing dsRNA corresponding to either ZC3H41 or Z41AP. Protein levels were monitored by immunoblot using BB2 or anti-protein A antisera that detect 4xTy or TAP tags, respectively. α -tubulin was used as a loading control. For other abbreviations, see Fig. 1

case (Fig. 2b). Most of the protein interactions were lost when the cell lysate was treated with a mixture of RNases A and T1; the association of ZC3H41 with Z41AP, however, was resistant to RNases digestion (Fig. 2b). Moreover, both proteins remain associated with each other in the presence of a high salt concentration (see below), and are found at roughly equal levels within the cell according to proteomic surveys (Additional file 5; [53, 56]). These results strongly suggest that ZC3H41 and Z41AP form a stable heterodimer in vivo. Silencing of Z41AP expression by RNAi led to inhibition of cell growth (Fig. 2c), indicating that this protein is also essential in procyclic trypanosomes. In contrast to ZC3H41 RNAi, however, depletion of Z41AP resulted in minimal cell cycle defects, as judged by flow cytometry (Fig. 2d). To study whether the depletion of ZC3H41 had an effect on the levels of Z41AP and vice versa, we generated a cell line that expressed both proteins with a different tag (4xTy-ZC3H41 and TAP-Z41AP). The resulting cell line was transfected with plasmids targeting either ZC3H41 or Z41AP for RNAi. As shown in Fig. 2e, the independent depletion of either protein had no effect on the levels of the corresponding partner, indicating that both proteins are stable as free species within the cell.

ZC3H41 and Z41AP are RNA-binding proteins

ZC3H41 and Z41AP were purified upon SL-RNA chromatography [30], and both proteins were detected in the trypanosome mRNA-bound proteome [57], which suggests a role as RNA-binding proteins. To validate that ZC3H41 and Z41AP are able to bind RNA in vivo, living trypanosomes were irradiated with UV light, and ZC3H41/Z41AP ribonucleoprotein complexes were immunoprecipitated (from cell lines expressing either TAP-ZC3H41 or TAP-Z41AP) and washed in high-salt conditions (1 M NaCl); associated RNAs were then end-labeled using polynucleotide kinase and [γ - 32 P]ATP. Cell lines expressing the TAP tag alone or TAP-DRBD3/PTB1, a bona fide RNA-binding protein [40, 58], were used as negative or positive controls, respectively. As shown in Fig. 3, strongly labeled bands of the expected sizes could be observed in UV-treated cells, whereas no or low labeling was detected in non-irradiated samples or in the cell line expressing the TAP tag alone (Fig. 3a). These results indicate that ZC3H41 and Z41AP are genuine RNA-binding proteins.

Depletion of ZC3H41 has minor effects on the transcriptome of procyclic trypanosomes

The transcriptome of ZC3H41-depleted cells was examined by high-throughput sequencing (RNA-seq) after 2 days of tetracycline induction, and compared to that of control cells. Differential abundance analyses were

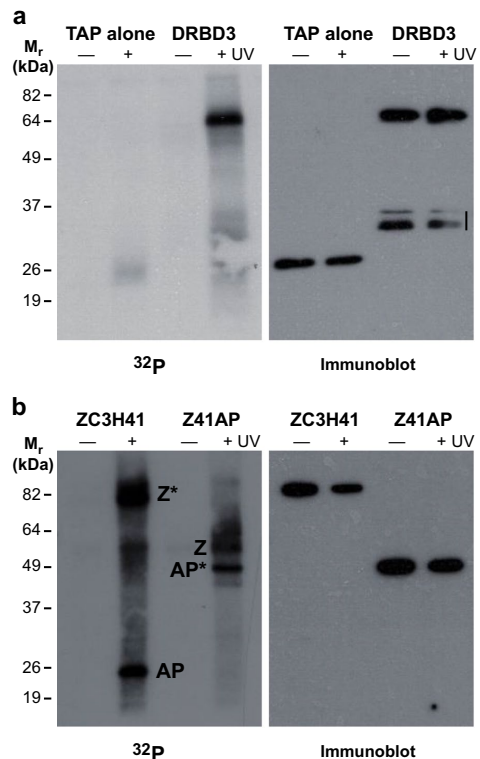


Fig. 3a, b ZC3H41 and Z41AP bind RNA in vivo. Cell lines expressing TAP-DRBD3, TAP-ZC3H41, TAP-Z41AP or TAP tag alone were irradiated (+) or not (-) with ultraviolet light. TAP-tagged proteins were immunoprecipitated using paramagnetic immunoglobulin G beads, end-labeled with [γ - 32 P]ATP and polynucleotide kinase (PNK), and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and PhosphorImager detection [32 P] (left panels); TAP-tagged proteins were also visualized by immunoblot using Papanicolaou reagent [Immunoblot (right panels)]. **a** Trypanosomes expressing the TAP tag alone or TAP-DRBD3 were used as negative or positive controls, respectively; bands below TAP-DRBD3 probably represent degradation products (vertical line). **b** Immunoprecipitation and PNK labeling of cells expressing either TAP-ZC3H41 (Z) or TAP-Z41AP (AP). TAP-tagged species are indicated with asterisks. For other abbreviations, see Figs. 1 and 2

carried out with edgeR using cutoffs of 1 for $|\log_2|$ fold change (i.e. \pm twofold linear fold change) and 0.01 for false discovery rate (FDR). A volcano plot for the differentially expressed genes in ZC3H41-silenced cells is shown in Fig. 4a. Only 44 transcripts were differentially expressed, including the mRNA encoding ZC3H41, as expected (Figs. 4a, b; Additional files 6, 7). In general, ZC3H41-regulated transcripts seem to be expressed

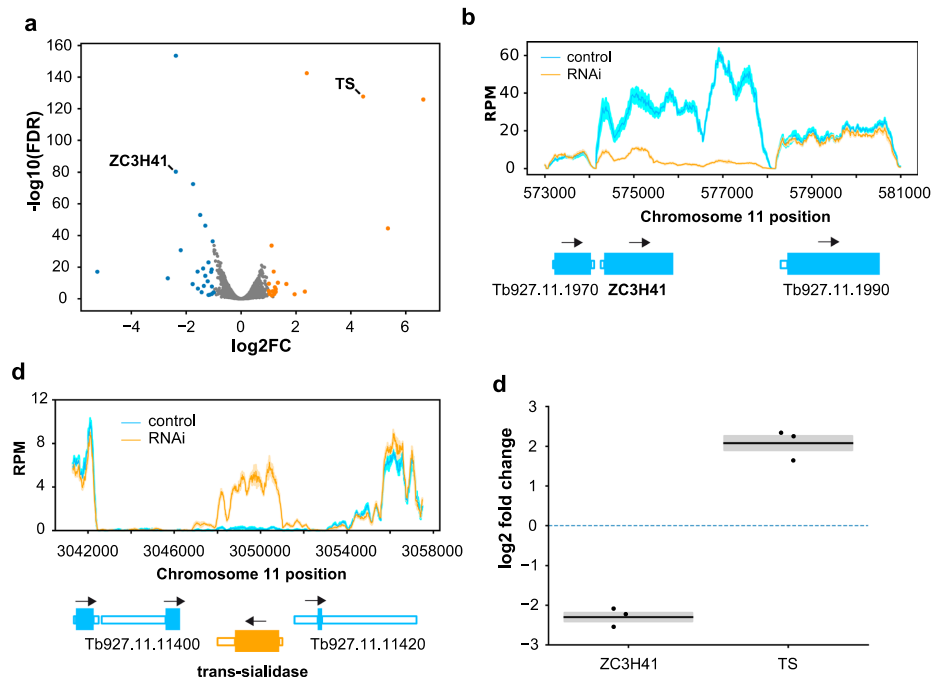


Fig. 4a–d Effects of ZC3H41 depletion on the transcriptome of procyclic *Trypanosoma brucei*. **a** Volcano plot of differential gene expression in ZC3H41-depleted cells compared to control cells. Blue dots correspond to downregulated transcripts, orange dots indicate upregulated transcripts, and grey dots represent unregulated messenger RNAs (mRNAs); thresholds for differential abundance were $|\log_2$ fold change > 1 and false discovery rate < 0.01 . **b, c** Coverage plots of ZC3H41 and Tb927.11.11410 loci. Read counts were analyzed with sliding windows (100-base pair bins, 10-base pair steps) and normalized by library size (reads per million). Open-reading frames are represented as thick, filled boxes, untranslated regions as thin, open boxes; arrows indicate the direction of transcription. Reads per million values are represented as the mean (solid lines) \pm SEM (shaded area) of three RNA-seq biological replicates. **d** Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis to confirm proper ablation of ZC3H41 mRNA and upregulation of trans-sialidase (TS) transcript. Fold changes (\log_2 converted) are expressed as the mean (horizontal lines) \pm SEM (shaded areas) of three independent RNAi inductions in procyclic trypanosomes (dots). The horizontal dashed line indicates $\log_2 = 0$, i.e. no change in gene expression

at low abundance, and almost half of them (43%) are probably non-coding, since the corresponding encoded proteins have not been detected in proteomic surveys (Additional file 6). A few mRNAs differentially regulated by ZC3H41 were previously observed to be also differentially regulated upon depletion of other proteins (Additional file 6). A transcript encoding a trans-sialidase (Tb927.11.11410) was clearly upregulated in ZC3H41-depleted cells (Fig. 4a, c; Additional files 6, 7). This transcript is poorly expressed in procyclic cells (Fig. 4c; Additional file 7; [51]). Interestingly, the corresponding gene is located in reverse orientation within a polycistronic transcriptional unit (Fig. 4c), and the encoded trans-sialidase seems to be expressed at least in bloodstream forms, as judged by mass spectrometry analysis [56, 59]. Downregulation of ZC3H41 and upregulation

of trans-sialidase Tb927.11.11410 transcripts were confirmed by quantitative RT-PCR (Fig. 4d).

ZC3H41/Z41AP complex binds to ribosomal protein mRNAs

We showed above that ZC3H41 and Z41AP are bona fide RNA-binding proteins. To identify the cohort of mRNAs bound to the ZC3H41/Z41AP complex, we performed TAP followed by high-throughput sequencing (RIP-seq) using Z41AP as bait. Z41AP-TAP purification, generation of RNA-seq libraries and Illumina sequencing were done in parallel with a RIP-seq of another RNA-binding protein complex, PuREBP1/2 [32], and thus we used the latter TAP as a control to identify mRNAs specifically associated with ZC3H41/Z41AP. The two datasets were analyzed using either edgeR or the peak caller MACS2 to identify mRNAs enriched in the TAP-purified fractions;

both approaches have been used successfully in RIP-seq experiments [32, 60–62]. MACS2 scores showed better correlation with quantitative RT-PCR data (see below) than edgeR logFC values (Pearson's $r=0.559$ vs 0.242; Additional file 8), and therefore we used the former approach to assess for specificity. Based on the MACS2 scores obtained for *NT8* and *AATP6* mRNAs in the PuREBP1-TAP dataset, which are known components of the PuREBP1/2 complex [32], we considered transcripts showing MACS2 score values >7000 as highly likely to be genuine ZC3H41/Z41AP targets. This gave us a list of 104 mRNAs (Fig. 5a; Additional file 9). There was a notable abundance of mRNAs encoding ribosomal proteins,

which comprised 69% of all transcripts in the final list (Fig. 5a; Additional file 9). Moreover, the top 40 scoring transcripts corresponded almost exclusively (38/40) to ribosomal protein mRNAs (Additional file 9). Accordingly, gene ontology analysis of this subset revealed a clear enrichment in 'ribosome biogenesis' and 'translation' categories within the 'biological process' ontology (FDR <0.0001), and in 'structural constituent of ribosome' and 'rRNA binding' categories within the 'molecular function' ontology (FDR <0.0001).

To confirm binding of target mRNAs to the ZC3H41/Z41AP complex, we performed quantitative RT-PCR assays following RIP using either TAP-ZC3H41 or

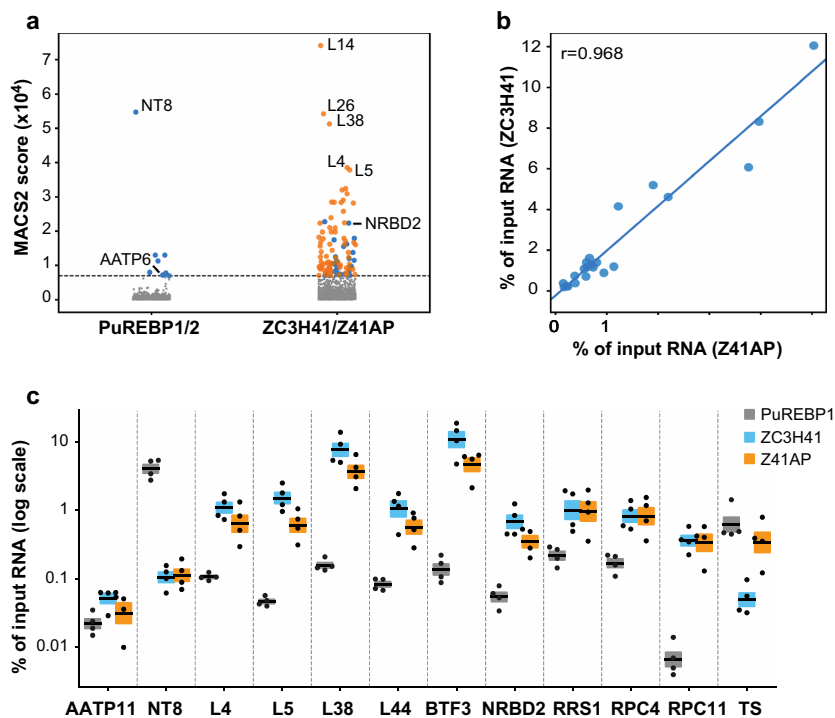


Fig. 5a–c Identification of the cohort of mRNAs bound to the ZC3H41-Z41AP complex by RNA immunoprecipitation sequencing (RIP-seq). **a** MACS2 analysis of the PuREBP1/2- and ZC3H41/Z41AP-bound transcriptomes. Immunoprecipitated transcripts identified by MACS2 were ranked according to their MACS2 score. A threshold of 7000 (horizontal dashed line) was set up based on the scores of *NT8* and *AATP6*, which are bona fide targets of the PuREBP1/2 complex. Blue dots and grey dots correspond to transcripts that are, or are not, highly likely to be genuine targets, respectively. Orange dots indicate mRNAs encoding ribosomal proteins; none was detected above threshold scores in PuREBP1/2 purifications. **b** Correlation analysis of RIP followed by quantitative RT-PCR obtained using TAP-Z41AP or TAP-ZC3H41 as baits (see below); values indicate percentages of immunoprecipitated transcripts relative to input RNA. **c** RIP followed by quantitative RT-PCR to confirm association of the indicated transcripts to either ZC3H41, Z41AP or PuREBP1 (as a negative control). *AATP11* (and *NT8* in ZC3H41 and Z41AP purifications) were used as non-bound controls. *L38* data correspond to the Tb927.9.2020 paralog (see Additional File 8 for the Tb927.10.3280 paralog). Percentages of immunoprecipitated RNA relative to input RNA are expressed as the mean (horizontal lines) \pm SEM (shaded areas) of four independent RIPs (dots). For other abbreviations, see Figs. 1, 2 and 4

TAP-Z41AP as baits; PuREBP1-TAP purifications were used as negative controls. We observed a strong correlation (Pearson's $r=0.968$) between TAP-ZC3H41 and TAP-Z41AP quantitative RT-PCR enrichment values (Fig. 5b), which further supports the association of both proteins within the cell and strengthens the specificity of the assay. We could confirm the association of ZC3H41/Z41AP complex with transcripts encoding ribosomal proteins L4, L5, L7a, L14, L36, L37, L44, S8 and two paralogs of L38, the basic transcription factor BTF3, the RNA-binding protein NRBD2 (also known as p37 [10], which has been described as a constituent of the ribosome [63]), the ribosomal biogenesis regulatory protein RRS1 [11], the subunits of RNA polymerase III RPC4 and RPC11, and the translation factor eIF1A (Fig. 5c; Additional file 8). All these transcripts were significantly more enriched (two-sided Student's t -test, $n=4$, $P < 0.05$) in TAP-ZC3H41 or TAP-Z41AP purifications than in PuREBP1-TAP samples (Fig. 5c; Additional file 8). This did not represent inefficient immunoprecipitation of PuREBP1/2 ribonucleoprotein complexes since *NT8* mRNA could be readily detected upon TAP purification of PuREBP1 but not in TAP-ZC3H41 or TAP-Z41AP purifications (Fig. 5c). The transcript encoding the transalidase Tb927.11.11410 was not found significantly associated with ZC3H41/Z41AP (TS; Fig. 5c), and was not detected in MACS2 or edgeR analyses either. Therefore, the increase in transalidase mRNA abundance observed

in ZC3H41-depleted cells was probably due to secondary effects unrelated directly to ZC3H41/Z41AP binding.

Using immunoblot assays, we next assessed whether the abundance of some proteins encoded by ZC3H41/Z41AP-bound transcripts was affected in ZC3H41-depleted trypanosomes. As shown in Additional file 8, neither the levels of NRBD2 nor those of ribosomal proteins P0 or S9 (whose corresponding transcripts were also found associated with ZC3H41/Z41AP; see Additional file 9) were altered after 48 h of RNAi induction.

The association of ZC3H41/Z41AP with target mRNAs decreases under nutritional stress

Upon nutritional starvation, both ZC3H41 and Z41AP accumulate in stress granules, but mRNAs encoding ribosomal proteins are underrepresented in these structures [31]. Since we showed above that ZC3H41/Z41AP complex binds mainly to transcripts coding for ribosomal components in normal growth conditions, we next assessed whether there was a decrease in the association of ZC3H41/Z41AP with mRNAs encoding ribosomal proteins upon nutritional stress. Cells expressing TAP-ZC3H41 were subjected to nutritional starvation for 3 h, and binding of the ZC3H41/Z41AP complex to target transcripts was tested by RIP followed by quantitative RT-PCR as above. Indeed, we could observe a significant decrease in binding (two-sided Student's t -test, $n=4$,

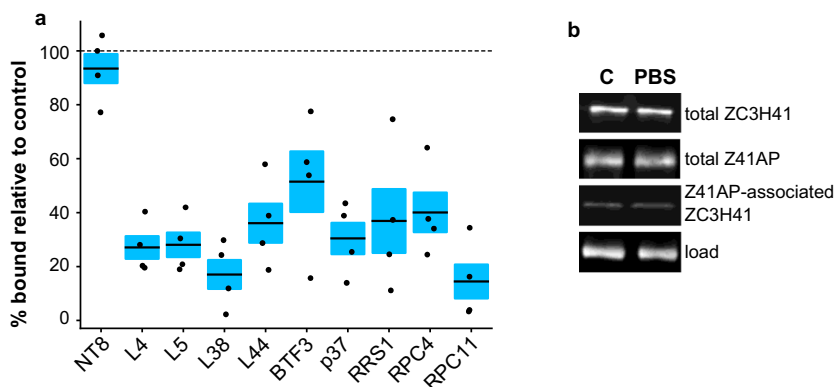


Fig. 6a, b Association of ZC3H41/Z41AP with target mRNAs under nutritional stress. **a** Cells expressing TAP-ZC3H41 were incubated in normal growth medium or in phosphate-buffered saline for 3 h, and association with the indicated transcripts was assessed by RIP followed by quantitative RT-PCR. *NT8* transcript was used as a non-bound control. Percentages of immunoprecipitated RNA under starvation stress relative to those measured in normal conditions are expressed as the mean (horizontal lines) \pm SEM (shaded areas) of four independent RIPs (dots). The horizontal dashed line indicates 100% binding in starvation relative to normal growth (i.e. no changes in binding). **b** ZC3H41 and Z41AP levels are unaltered in starved cells. Double-tagged cells expressing both 4xTy-ZC3H41 and TAP-Z41AP were subjected to starvation as described above. Total ZC3H41 or Z41AP levels, as well as those of ZC3H41 associated with Z41AP upon TAP purification, were assessed by immunoblot using antibodies against the tags. α -tubulin served as a loading control for total levels. For other abbreviations, see Figs. 1, 2, 4 and 5

$P < 0.05$) in all tested ZC3H41/Z41AP-associated mRNAs upon nutritional stress (Fig. 6a). Loss of binding under starvation does not seem to be a general effect due to stress, since other trypanosomal RNA-binding proteins remain associated with their target transcripts in stress conditions [42] or are even more prone to associate with mRNAs [64].

We also assessed whether the expression of ZC3H41 or Z41AP was itself altered under nutritional stress. As shown in Fig. 6b, the levels of total ZC3H41, total Z41AP, and Z41AP-associated ZC3H41 remained unchanged under starvation.

ZC3H41 and Z41AP are involved in 5S rRNA biogenesis, and their depletion results in decreased global translation

Several of the ZC3H41/Z41AP-associated mRNAs encode proteins that have been shown to be important for 5S rRNA maturation: NRBD2/p37 [10], RRS1 [11], and the ribosomal proteins L5 and L11 [12, 13] (Additional file 9). To investigate whether ZC3H41 and/or Z41AP have a role in this process, we measured the levels of mature 5S and pre-5S species by quantitative RT-PCR in ZC3H41- or Z41AP-depleted trypanosomes, and compared them to those of uninduced cells. As seen in Fig. 7,

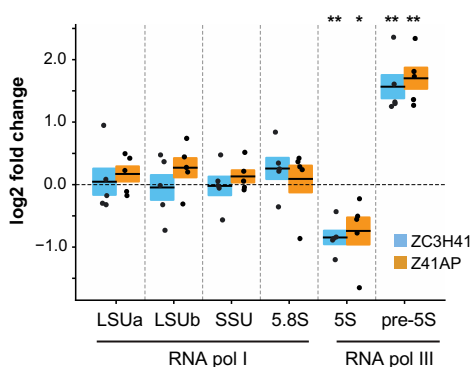


Fig. 7 Effect of ZC3H41 or Z41AP depletion on the levels of different ribosomal RNAs (rRNAs). Total RNA was extracted from uninduced and ZC3H41- or Z41AP-depleted cells, and the levels of the indicated rRNA species (transcribed by RNA polymerase I or III, as indicated) were assayed by quantitative RT-PCR. Fold changes (\log_2 converted) relative to uninduced cells are expressed as the mean (horizontal solid lines) \pm SEM (shaded areas) of five independent RNAi inductions (dots). The horizontal dashed line indicates $\log_2 = 0$, i.e. no change in gene expression. Two-sided Student's *t*-tests ($n = 5$) were used to assess whether rRNA levels were significantly altered upon depletion of ZC3H41 or Z41AP. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$; differences in large subunit, small subunit and 5.8S levels were found to be not significant ($P > 0.19$ in all cases). For other abbreviations, see Figs. 1, 2 and 4

we could detect a significant > threefold (linear) increase in the levels of pre-5S upon knockdown of either ZC3H41 or Z41AP, whereas the amount of mature 5S rRNA significantly decreased about 1.7-fold in both cases. This effect seems to be specific for 5S rRNA, as the levels of mature large subunit, small subunit and 5.8S rRNA species did not significantly change in either RNAi. These results suggest that ZC3H41 and Z41AP are involved in the 5S rRNA maturation process in *T. brucei*.

The fact that the ZC3H41/Z41AP complex binds to ribosomal protein mRNAs and its loss seems to interfere with rRNA processing prompted us to assess whether ZC3H41 or Z41AP depletion had any effect on protein translation. To this end, we used the surface sensing of translation assay, which is based on the incorporation of puromycin into nascent proteins and subsequent detection of puromycylated polypeptides using an anti-puromycin antibody [52]. A significant twofold decrease in puromycin incorporation was observed upon depletion of ZC3H41 or Z41AP compared to uninduced cells (Fig. 8), indicating that loss of ZC3H41/Z41AP led to a global reduction in translation. These changes are in the same range as those reported for the RNA helicase Hel66, which is also involved in the maturation of rRNAs [8]. Importantly, translation was not significantly altered upon depletion of the RNA-binding protein PuREB1 (Fig. 8), which is essential for cell growth [32], ruling out unspecific effects due to cell death.

Discussion

Regulation of gene expression in trypanosomatids relies heavily on post-transcriptional mechanisms, and is exerted mainly through the action of RNA-binding proteins [18, 19]. Among these, CCCH-type zinc finger proteins have been shown to play important roles in the regulation of cell differentiation, protein translation, cell cycle and surface antigen expression [21–29]. ZC3H41 is a zinc finger protein that associates with stress and SL granules, and it is secreted in exosome vesicles [30, 31]; however, the function of this essential protein remains unclear to date. In this work we have shown that depletion of ZC3H41 results in severe cell cycle defects leading to a marked accumulation of zoids and multinucleated cells, suggesting that in the absence of ZC3H41, trypanosomes can progress through mitosis normally, but are then unable to segregate nuclei into daughter cells. ZC3H41 ablation also produced cells with an abnormal cell morphology elongation compatible with the nozzle phenotype observed for the first time in cells ectopically expressing the zinc finger protein ZFP2 [21], and later on upon ablation of the nuclear RNA-binding protein RRM1 [65], the cyclin CYC2 [66] and the ethanolamine-phosphate cytidyltransferase [67]. It is still unknown what

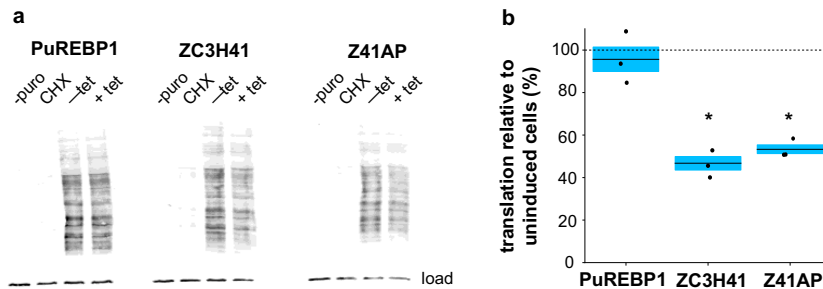


Fig. 8a, b Effect of ZC3H41 or Z41AP depletion on protein synthesis. **a** Immunoblot showing puromycin incorporation into nascent polypeptides. Uninduced cells not treated with puromycin (– puro), uninduced cells incubated in the presence of cycloheximide 30 min prior to treatment with puromycin (CHX), uninduced cells treated with puromycin (– tet), cells treated with puromycin after 48 h of RNA induction (+ tet). Puromycylated polypeptides were detected using an anti-puromycin antibody. DRBD3 was used as a loading control. **b** Quantification of the puromycin signal from the immunoblot. Percentages of puromycylated polypeptides upon depletion by RNAi relative to those measured in uninduced cells are expressed as the mean (horizontal lines) \pm SEM (shaded areas) of three independent RNAi inductions (dots). The horizontal dashed line indicates 100% puromycin signal relative to uninduced cells (i.e. no changes in translation). Two-sided Student's *t*-tests ($n = 3$) were used to assess whether translation rates were significantly altered upon depletion of PuREBP1, ZC3H41 or Z41AP. * $P < 0.05$; differences observed upon depletion of PuREBP1 were found to be not significant ($P = 0.56$). For other abbreviations, see Figs. 1 and 2

triggers the appearance of nozzled cells, but it could be due to mechanisms related to cell differentiation [17].

ZC3H41 forms a stable heterodimer with a protein that we have named Z41AP in this work. Both proteins are able to bind RNA as judged by UV crosslinking and PNK labeling experiments. Z41AP is also essential for proliferation in procyclic trypanosomes, but cell cycle and cell morphology were little affected in Z41AP-depleted trypanosomes, indicating that ZC3H41 could have additional and specific functions within the heterodimer. In agreement with this, ZC3H41 and Z41AP are apparently stable in the absence of the corresponding partner, and inhibition of cell growth was more evident in ZC3H41-depleted trypanosomes (i.e. compare Fig. 1a with Fig. 2c). Alternatively, these differences could be simply due to lower RNAi efficiencies in Z41AP-depleted cells. The ZC3H41/Z41AP heterodimer was also associated with both poly(A)-binding proteins, PABP1 and PABP2, and with the translation factors eIF4E4. It has been shown that PABP1 and PABP2 form distinct protein complexes in *T. brucei*, and that ZC3H41, Z41AP and eIF4E4 are found associated predominantly with PABP1 complexes together with the RNA-binding protein RBP23 and the translation factor eIF4G3; ZC3H41 and Z41AP also associate with PABP2 complexes, to a lesser extent [68]. Furthermore, PABP1, ZC3H41, Z41AP and eIF4E4 co-purify with the RNA-binding protein RBP23 in the related parasite *Leishmania infantum* [69]. Our TAP data show that PABP1, PABP2 and eIF4E4 are associated with the ZC3H41/Z41AP heterodimer in sub-stoichiometric amounts. Thus, although ZC3H41 and Z41AP seem to

associate with PABP complexes (mainly PABP1 according to [68]), the ZC3H41/Z41AP heterodimer likely exists as a free species as well. This is supported by the observation that ZC3H41 and Z41AP are more abundant than PABP1, and are also in clear excess relative to either eIF4E4 or RBP23 proteins (Additional file 5). In addition, ZC3H41 and Z41AP could be present as independent entities as well. Ribosomal proteins were also detected in TAP-purified ZC3H41/Z41AP complexes. These probably represent contaminants, as ribosomal proteins are common in TAP purifications of other RNA-binding proteins [70]. However, a specific binding of ZC3H41/Z41AP to ribosomes is also plausible, since ZC3H41 has been found associated with polysomes in *T. brucei* [71].

Depletion of ZC3H41 led to minimal changes in the transcriptome, suggesting that the main role of this protein is unrelated to mRNA turnover. RIP-seq of ZC3H41/Z41AP complexes, on the other hand, revealed that they are mainly associated with ribosomal protein mRNAs, as 72 of the 104 top-ranked bound transcripts encode ribosomal proteins. Excluding paralogs, 46 of the 77 protein components of the *T. brucei* ribosome [63, 72] are encoded by ZC3H41/Z41AP-associated mRNAs (Additional file 9). This number is probably even higher, as several ribosomal protein transcripts have MACS2 scores just below the threshold, and we have shown binding of sub-threshold mRNAs to ZC3H41/Z41AP (Additional file 9). Depletion of ZC3H41 did not alter the levels of the ribosomal proteins S9 and P0, nor those of p37/NRBD2 (which is also a component of the ribosome [63]), which suggests that ZC3H41 does not regulate protein

abundance either. In agreement with this, a genome-wide survey for post-transcriptional regulators in *T. brucei* showed that tethering of ZC3H41 or Z41AP to a reporter gene did not result in apparent changes in gene expression [73].

As mentioned above, ZC3H41 and Z41AP associate with PABP1 complexes together with the RNA-binding protein RBP23 and the translation factor eIF4E4 [68]. It has been proposed that the *T. brucei* PABP1 complex is specialized in the regulation of a small subgroup of mRNAs probably encoding ribosomal proteins [68], in line with the observation that ribosomal protein mRNAs are found associated with RBP23 in *L. infantum* [69] and eIF4E4 in *T. brucei* [74]. Moreover, it has been shown that both ribosomal protein mRNAs and PABP1 complexes are selectively excluded from stress granules upon starvation [68], and we have demonstrated here that ZC3H41/Z41AP complexes are significantly less associated with transcripts encoding ribosomal proteins upon nutritional stress. Since ZC3H41 and Z41AP locate to stress granules in starvation conditions [31], it is tempting to speculate that these proteins are involved in the selective transport of ribosomal protein mRNAs within the cell, and that ZC3H41/Z41AP ribonucleoprotein complexes are remodeled in response to environmental cues. In this regard, ZC3H41 has been shown to accumulate in secreted exosome vesicles that are thought to transmit stress signals for communication between parasites [30]. Phosphorylation of ZC3H41 is increased upon heat shock stress, as identified from mass spectrometry-based phosphoproteomic analysis [75]. Therefore, it is also possible that ZC3H41 and/or Z41AP are phosphorylated in response to starvation stress as well, resulting in differential binding to target mRNAs depending on nutrient availability.

The presence of transcripts encoding several factors involved in the maturation of 5S rRNA prompted us to investigate whether depletion of ZC3H41 or Z41AP had any effect on 5S maturation. We could detect both accumulation of 5S rRNA precursors and a significant decrease of mature 5S species, whereas the levels of other rRNA species remained apparently unaltered. 5S rRNA is transcribed by RNA pol III, whereas all other rRNAs are synthesized by RNA polymerase I. Interestingly, we have shown that two components of the RNA polymerase III complex, RPC4 and RPC11, are found in ZC3H41/Z41AP ribonucleoprotein complexes. Thus, in addition to having a role in regulating the fate of ribosomal protein mRNAs, the ZC3H41/Z41AP complex seems to be involved in the biogenesis of 5S rRNA. In agreement with this, a fraction of ZC3H41 seems to localize inside the nucleus [54]. Both types of RNAs (mRNAs encoding ribosomal proteins,

and 5S rRNA) are prominently abundant within the cell. Therefore, one would expect ZC3H41 and Z41AP levels to be correspondingly high as well. Indeed, both proteins are among the top 5% most abundant proteins in procyclic trypanosomes (Additional file 5), and are also clearly the most abundant when compared to all CCCH zinc finger proteins in *T. brucei* (Additional files 5, 10).

Depletion of ZC3H41 led to few changes in the transcriptome, and the levels of three different proteins encoded by ZC3H41/Z41AP-associated mRNAs were not apparently altered either. Thus, the function of the ZC3H41/Z41AP complex is likely related to the transport of a specific cohort of transcripts in response to environmental cues. This is supported by the fact that association to target mRNAs is diminished upon nutritional stress, and that, as mentioned above, ZC3H41 is enriched in vesicles secreted to the extracellular medium. Since ribosomal protein mRNAs are specifically enriched in the ZC3H41/Z41AP-bound transcriptome, and this complex is also involved in 5S rRNA processing, it is tempting to speculate that ZC3H41 and Z41AP are involved in controlling the fate of the translation machinery in response to environmental cues. In this regard, we have shown that loss of either ZC3H41 or Z41AP leads to a reduction in translation. In addition, ZC3H41/Z41AP could play important roles in other stages of the *T. brucei* life cycle. For instance, it is known that the translation efficiencies of ribosomal components are diminished in metacyclic infective forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* [76, 77], whereas translation of trans-sialidase virulence factors is upregulated in metacyclic *T. cruzi* trypanosomes [76]. Interestingly, Z41AP and ZC3H41 protein levels are 2.2- to 2.4-fold less abundant in non-dividing metacyclic trypanosomes than in proliferative procyclic forms of *T. brucei* [77]. Further insights into the role of the ZC3H41/Z41AP complex will greatly benefit from the study of these essential proteins in other trypanosomal life forms.

Conclusions

ZC3H41 is an essential zinc finger protein of the CCCH family which is known to locate to stress granules and exosome vesicles upon stress; however, the function of this intriguing protein in RNA metabolism remains unknown. In this work we show that ZC3H41 forms a stable heterodimer with another essential RNA-binding protein, Z41AP, and that the heterodimer also associates with the PABP1 complex. Using RNA-seq we show that ZC3H41 and Z41AP bind to mRNAs encoding ribosomal protein mRNAs and factors involved in 5S rRNA biogenesis. We also show that these transcripts are less associated with ZC3H41/Z41AP upon

nutritional stress, and that depletion of ZC3H41 or Z41AP results in defects in 5S rRNA processing and a decrease in global translation. We propose that the ZC3H41/Z41AP complex is involved in the selective transport of ribosomal protein mRNAs within the cell, and that these ribonucleoprotein complexes are remodeled in response to environmental cues. Our work provides an interesting basis on which to further explore how trypanosomes link nutritional sensing with regulation of gene expression.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05728-x>.

Additional file 1: Table S1. Oligodeoxynucleotides used in this work.

Additional file 2: Figure S1. Localization of TAP-ZC3H41 and flow cytometry of ZC3H41-depleted cells. **a** Immunoblot of the cell lines expressing TAP-tagged versions of ZC3H41 and Tb927.7.7460 (Z41AP). **b** TAP-ZC3H41 localization was analyzed by immunofluorescence using an anti-protein A antiserum. **c** Representative flow cytometry plots are shown for uninduced or ZC3H41-depleted cell lines stained with propidium iodide.

Additional file 3: Figure S2. RNA interference of ZC3H41 using a different double-stranded RNA. Cells expressing TAP-ZC3H41 were transfected with a different tetracycline-inducible RNAi plasmid. **a** Growth curve of uninduced or RNAi-induced trypanosomes. **b** ZC3H41-depleted cells were mounted in mounting medium containing DAPI and analyzed for the appearance of zoids and 'nozzled' cells.

Additional file 4: Table S2. List of proteins associated with ZC3H41.

Additional file 5: Figure S3. Protein abundances of ZC3H41 and Z41AP. Data from deep proteome surveys carried out in bloodstream and pro-cyclic trypanosomes were plotted according to protein intensity-based absolute quantification (iBAQ) values or protein abundance rank positions. **a** Components of the PABP1 complex. **b** *Trypanosoma brucei* zinc finger proteins of the CCCH class.

Additional file 6: Table S3. Effect of ZC3H41 depletion on the transcriptome of procyclic *Trypanosoma brucei*.

Additional file 7: Table S4. Raw read counts mapped to transcripts upon depletion of ZC3H41 in procyclic *Trypanosoma brucei*.

Additional file 8: Figure S4. Additional information related to ZC3H41/Z41AP RIP-seq. **a** Correlation analysis between the percentages of immunoprecipitated target mRNAs and MACS2 score or edgeR fold change values. **b** RIP followed by quantitative RT-PCR to confirm association of the indicated transcripts with ZC3H41/Z41AP. **c** Effect of ZC3H41 depletion on NRBD2, P0 and S9 protein levels.

Additional file 9: Table S5. Transcripts associated with the ZC3H41/Z41AP complex.

Additional file 10: Table S6. Protein abundances of zinc finger proteins of the CCCH family in *Trypanosoma brucei*.

Acknowledgements

We thank Mark Carrington and Nancy Standart for helpful discussion, and Noreen Williams, Steve Reed and Christine Clayton for antisera.

Author contributions

GCP and AME designed the project. GCP, MRJ and AME designed the experiments. GCP, MRJ, CGL and AME performed the experiments. GCP, MRJ and AME analyzed the data. AME wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work was funded by the Spanish National Research Council (CSIC) (grant 201920E114 to AME). The funding body had no role in the design of the study, collection, analysis, interpretation of data, or in writing the manuscript.

Availability of data and materials

The RNA-seq datasets generated during the current study are available at the Gene Expression Omnibus repository (NCBI), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE213007>.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (IPBLN), CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento, 17, 18016 Armilla, Granada, Spain. ²Present Address: Estación Experimental del Zaidin (EEZ), CSIC, Prof. Albareda 1, 18008 Granada, Spain.

Received: 22 November 2022 Accepted: 3 March 2023

Published online: 31 March 2023

References

- Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:1427–64. <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1427>.
- Fernández-Moya SM, Estévez AM. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010;1:34–46. <https://doi.org/10.1002/wrna.6>.
- Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic Cell.* 2003. <https://doi.org/10.1128/EC.2.5.830-840.2003>.
- Clayton C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol.* 2019;9:190072. <https://doi.org/10.1098/rsob.190072>.
- Campbell DA, Kubo K, Clark CG, Boothroyd JC. Precise identification of cleavage sites involved in the unusual processing of trypanosome ribosomal RNA. *J Mol Biol.* 1987;196:113–24. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90514-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90514-6).
- Estévez AM, Kempf T, Clayton C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 2001;20:3831–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3831>.
- Cristodero M, Clayton CE. Trypanosome MTR4 is involved in rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:7023–30. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm736>.
- Bakari-Soale M, Josephat Ikenga N, Scheibe M, Butter F, Kramer S, Engstler M, et al. The nucleolar DEX/DH protein Hel66 is involved in ribosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep.* 2021;11:18325. <https://doi.org/10.1101/2021.06.11.448066>.
- Chikne V, Rajan KS, Shalev-Benami M, Decker K, Cohen-Chalarnish S, Madmoni H, et al. Small nucleolar RNAs controlling rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:2609–29. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1287>.
- Hellman KM, Ciganda M, Brown SV, Li J, Ruyechan W, Williams N. Two trypanosome-specific proteins are essential factors for 5S rRNA abundance and ribosomal assembly in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* 2007;6:1766–72. <https://doi.org/10.1128/EC.00119-07>.

11. Jaremko D, Ciganda M, Williams N. *Trypanosoma brucei* homologue of regulator of ribosome synthesis 1 (Rrs1) has direct interactions with essential trypanosome-specific proteins. *mSphere*. 2019. <https://doi.org/10.1128/msphere.00453-19>.
12. Ciganda M, Prohaska K, Hellman K, Williams N. A novel association between two trypanosome-specific factors and the conserved I5–5S rRNA complex. *PLoS ONE*. 2012;7:41398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041398>.
13. Jaremko D, Ciganda M, Christen L, Williams N. *Trypanosoma brucei* L11 is essential to ribosome biogenesis and interacts with the kinetoplastid-specific proteins P34 and P37. *mSphere*. 2019. <https://doi.org/10.1128/msphere.00475-19>.
14. Shan F, Mei S, Zhang J, Zhang X, Xu C, Liao S, et al. A telomerase subunit homolog La protein from *Trypanosoma brucei* plays an essential role in ribosomal biogenesis. *FEBS J*. 2019;286:3129–47. <https://doi.org/10.1111/febs.14853>.
15. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerron J, et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*. 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>.
16. Clayton CE. Gene expression in kinetoplastids. *Curr Opin Microbiol*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.018>.
17. Matthews KR. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*. 2005;118:283–90. <https://doi.org/10.1242/jcs.01649>.
18. Kramer S, Carrington M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends Parasitol*. 2011;27:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.011>.
19. Clayton C. The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003680. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003680>.
20. Kramer S, Kimblin NC, Carrington M. Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *BMC Genomics*. 2010;11:283. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-283>.
21. Hendriks EF, Robinson DR, Hinkins M, Matthews KR. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *EMBO J*. 2001;20:6700–11. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6700>.
22. Hendriks EF, Matthews KR. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. *Mol Microbiol*. 2005;57:706–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04679.x>.
23. Benz C, Mulindwa J, Ouna B, Clayton C. The *Trypanosoma brucei* zinc finger protein ZC3H18 is involved in differentiation. *Mol Biochem Parasitol*. 2011;177:148–51. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.02.007>.
24. Ling AS, Trotter JR, Hendriks EF. A zinc finger protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *J Biol Chem*. 2011;286:20152–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139261>.
25. Walrad PB, Capewell P, Fenn K, Matthews KR. The post-transcriptional trans-acting regulator, TbZFP3, co-ordinates transmission-stage enriched mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:2869–83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1106>.
26. Droll D, Minia I, Fadda A, Singh A, Stewart M, Queiroz R, et al. Post-transcriptional regulation of the trypanosome heat shock response by a zinc finger protein. *PLoS Pathog*. 2013;9:1003286. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003286>.
27. Erben E, Leiss K, Liu B, Gil DI, Helbig C, Clayton C. Insights into the functions and RNA binding of *Trypanosoma brucei* ZC3H22, RBP9 and DRBD7. *Parasitology*. 2021;148:1186–95. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000123>.
28. Bajak K, Leiss K, Clayton C, Erben E. A potential role for a novel ZC3H5 complex in regulating mRNA translation in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 2020;295:14291–304. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014346>.
29. Klein C, Terrao M, Clayton C. The role of the zinc finger protein ZC3H32 in bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177901>.
30. Eliaz D, Kannan S, Shaked H, Arvatz G, Tkacz ID, Binder L, et al. Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*. 2017;13:e1006245. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006245>.
31. Fritz M, Vanselow J, Sauer N, Lamer S, Goos C, Siegel TN, et al. Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:8013–32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv731>.
32. Rico-Jiménez M, Ceballos-Pérez G, Gómez-Liñán C, Estévez AM. An RNA-binding protein complex regulates the purine-dependent expression of a nucleobase transporter in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*. 2021;49:3814–25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab181>.
33. Biebinger S, Wirtz LE, Lorenz P, Clayton C. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;85:99–112. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(96\)02815-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02815-0).
34. Brun R, Schönenberger. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop*. 1979;36:289–92.
35. Clayton CE, Estévez AM, Hartmann C, Alibu VP, Field M, Horn D. Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol*. 2005;309:39–60. <https://doi.org/10.1385/1-59259-935-4:039>.
36. Kelly S, Reed J, Kramer S, Ellis L, Webb H, Sunter J, et al. Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;154:103–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.03.012>.
37. Bastin P, Bagherzadeh A, Matthews KR, Gull K. A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;77:235–9. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02598-4](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02598-4).
38. Zhang J, Williams N. Purification, cloning, and expression of two closely related *Trypanosoma brucei* nucleic acid binding proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;87:145–58. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00060-1).
39. Skeiky YAW, Benson DR, Elwasila M, Badaro R, Burns JM, Reed SG. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect Immun*. 1994;62:1643–51. <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.1643-1651.1994>.
40. Estévez AM. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:4573–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn406>.
41. Puig O, Caspari F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*. 2001;24:218–29. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1183>.
42. Fernández-Moya SM, García-Pérez A, Kramer S, Carrington M, Estévez AM. Alterations in DRBD3 ribonucleoprotein complexes in response to stress in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*. 2012;7:e48870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048870>.
43. Beckmann BM, Horos R, Fischer B, Castello A, Eichelbaum K, Alleaume AM, et al. The RNA-binding proteome from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat Commun*. 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms10127>.
44. Gómez-Liñán C, Gómez-Díaz E, Ceballos-Pérez G, Fernández-Moya SM, Estévez AM. The RNA-binding protein RBP33 dampens non-productive transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*. 2022;50:12251–65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1123>.
45. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:e108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt214>.
46. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30:923–30. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
47. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26:139–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
48. Ramírez F, Ryan DP, Grünig B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W160–5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>.
49. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*. 2008;9:R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>.

50. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 2010;26:841–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
51. TriTryp. <https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>. Accessed 31 Jan 2023.
52. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*. 2009;6:275–7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1314>.
53. Tinti M, Güther MLS, Crozier TWM, Lamond AJ, Ferguson MAJ. Proteome turnover in the bloodstream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei* measured by quantitative proteomics. *Wellcome Open Res*. 2019;4:152. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15421.1>.
54. TrypTag. <http://tryptag.org/>. Accessed 31 Jan 2023.
55. McKean PG. Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol*. 2003. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.010>.
56. Ferguson MAJ, Tinti M. Visualisation of proteome-wide ordered protein abundances in *Trypanosoma brucei*. *Wellcome Open Res*. 2022. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17607.1>.
57. Lueong S, Merce C, Fischer B, Hoheisel JD, Erben ED. Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. *Mol Microbiol*. 2016;100:457–71. <https://doi.org/10.1111/mmi.13328>.
58. Stern M, Gupta S, Salmon-Divon M, Haham T, Barda O, Levi S, et al. Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. *RNA*. 2009. <https://doi.org/10.1261/rna.1230209>.
59. Urbaniak MD, Güther MLS, Ferguson MAJ. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. *PLoS ONE*. 2012;7:e36619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036619>.
60. Fernández-Moya SM, Carrington M, Estévez AM. Depletion of the RNA-binding protein RBP33 results in increased expression of silenced RNA polymerase II transcripts in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*. 2014;9:e107608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107608>.
61. Mugo E, Erben ED. Identifying trypanosome protein–RNA interactions using RIP-Seq. In: Michels PAM, Ginger ML, Zilberstein D, editors. *Methods in molecular biology*. New York: Springer; 2020. p. 285–94. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0294-2_17.
62. McIntyre ABR, Gokhale NS, Cerchiotti L, Jaffrey SR, Horner SM, Mason CE. Limits in the detection of m6A changes using MeRIP/m6A-seq. *Sci Rep*. 2020;10:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63355-3>.
63. Brito Querido J, Mancera-Martínez E, Vicens Q, Boehler A, Chicher J, Simonetti A, et al. The cryo-EM structure of a novel 40S kinetoplastid-specific ribosomal protein. *Structure*. 2017;25:1785–1794.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.09.014>.
64. Alves LR, Oliveira C, Mörking PA, Kessler RL, Martins ST, Romagnoli BAA, et al. The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. *RNA Biol*. 2014;11:921–33. <https://doi.org/10.4161/ma.29622>.
65. Nittolo AG, Bañuelos CP, Saborit JI, Tekiel V, Sánchez DO, Levy GV. TbRRM1 knockdown produces abnormal cell morphology and apoptotic-like death in the bloodstream form of *T. brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2018;224:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.07.006>.
66. Hammarton TC, Engstler M, Mottram JC. The *Trypanosoma brucei* cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. *J Biol Chem*. 2004;279:24757–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401276200>.
67. Signorelli A, Gluenz E, Rettig J, Schneider A, Shaw MK, Gull K, et al. Perturbation of phosphatidylethanolamine synthesis affects mitochondrial morphology and cell-cycle progression in procyclic-form *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*. 2009;72:1068–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06713.x>.
68. Zoltner M, Krienitz N, Field MC, Kramer S. Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006679. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006679>.
69. Assis LA, Santos Filho MVC, da Cruz Silva JR, Bezerra MJR, de Aquino IRPUC, Merlo KC, et al. Identification of novel proteins and mRNAs differentially bound to the *Leishmania poly(A)* binding proteins reveals a direct association between pabp1, the RNA-binding protein rbp23 and mRNAs encoding ribosomal proteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009899>.
70. Ouna BA, Stewart M, Helbig C, Clayton C. The *Trypanosoma brucei* CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;183:184–8. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.02.006>.
71. Klein C, Terrao M, Gil DI, Clayton C. Polysomes of *Trypanosoma brucei*: association with initiation factors and RNA-binding proteins. *PLoS ONE*. 2015;10:e0135973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135973>.
72. Hashem Y, Des Georges A, Fu J, Buss SN, Jossinet F, Jobe A, et al. High-resolution cryo-electron microscopy structure of the *Trypanosoma brucei* ribosome. *Nature*. 2013;494:385–9. <https://doi.org/10.1038/nature11872>.
73. Erben ED, Fadda A, Lueong S, Hoheisel JD, Clayton C. A genome-wide tethering screen reveals novel potential post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004178. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004178>.
74. Bezerra MJR, Moura DMN, Freire ER, Holetz FB, Reis CRS, Monteiro TTS, et al. Distinct mRNA and protein interactomes highlight functional differentiation of major eIF4F-like complexes from *Trypanosoma brucei*. *Front Mol Biosci*. 2022;9:1–22. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.971811>.
75. Ooi CP, Benz C, Urbaniak MD. Phosphoproteomic analysis of mammalian infective *Trypanosoma brucei* subjected to heat shock suggests atypical mechanisms for thermotolerance. *J Proteomics*. 2020;219:103735. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103735>.
76. Smircich P, Eastman G, Bispo S, Duhagon MA, Guerra-Slompo EP, Garat B, et al. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. 2015;16:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1563-8>.
77. Christiano R, Kolev NG, Shi H, Ullu E, Walthert TC, Tschudi C. The proteome and transcriptome of the infectious metacyclic form of *Trypanosoma brucei* define quiescent cells primed for mammalian invasion. *Mol Microbiol*. 2017;106:74–92. <https://doi.org/10.1111/mmi.13754>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

